

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 876**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01N 25/08 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A61L 9/00 (2006.01)

F25B 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2013 PCT/KR2013/012052**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14098543**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2013 E 13865677 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2937414**

54 Título: **Composición para prevenir olores que incluyen microorganismos inodoros**

30 Prioridad:

21.12.2012 KR 20120150630

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.09.2019

73 Titular/es:

**HYUNDAI MOTOR COMPANY (100.0%)
12, Heolleung-ro, Seocho-gu
Seoul 137-938, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, JI WAN;
LEE, TAE HEE y
PARK, SO YOON**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 725 876 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición para prevenir olores que incluyen microorganismos inodoros

5 **(a) Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso de una composición para prevenir olores de un sistema de acondicionamiento de aire, que contiene microorganismos inodoros, o un cultivo de los mismos y un procedimiento para prevenir los olores de un sistema de acondicionamiento de aire utilizando la misma.

10

(b) Antecedentes de la técnica

El aire limpio es reconocido como un componente integral en la salud humana y el bienestar. Un olor desagradable o aire contaminado gravemente echa a perder un ambiente agradable. Por ejemplo, una calidad de aire interior insatisfactoria en una condición estanca al aire es causada por dos factores importantes. Uno de ellos son los contaminantes del aire generados directamente a partir de los materiales que constituyen el ambiente estando al aire (por ejemplo, construcción, vehículo, etc.) y el otro es el olor generado por las actividades humanas o causado por sustancias externas.

15

Un sistema de acondicionamiento de aire se refiere a un sistema diseñado para disminuir la temperatura interior y optimizar el ambiente interior en edificios, vehículos, trenes, barcos, aviones, etc., con el propósito de acondicionamiento de la temperatura, humedad, flujo y limpieza del aire. Con la mejora en el nivel de vida, el uso del sistema de acondicionamiento de aire ha ido aumentando gradualmente. Aunque ha habido mucha mejora en la función básica del sistema de acondicionamiento de aire, aún quedan por resolver una gran cantidad de problemas en el aspecto ambiental de la calidad del aire interior.

20

25

Se ha sabido que la causa del olor del sistema de acondicionamiento de aire, en particular un acondicionador de aire, son los metabolitos producidos por mohos y bacterias. Sin embargo, no se ha identificado específicamente todavía qué mohos y bacterias producen cuánto de dichos metabolitos.

30

En un sistema de acondicionamiento de aire, todo el aire que ha pasado a través de un soplador pasa a un núcleo de un evaporador. Durante el intercambio de calor entre un refrigerante frío y el aire, tiene lugar la condensación del agua en la superficie del núcleo de un evaporador debido a la diferencia de temperatura. Cuando la condensación de agua continúa, se crea un entorno favorable para habitar y proliferar mohos y bacterias en el núcleo de un evaporador. Si proliferan mohos y bacterias en el núcleo de un evaporador expuesto al aire exterior, se producen compuestos orgánicos volátiles microbianos (MVOCs) como metabolitos por los microorganismos. De este modo, cuando el aire que ha pasado a través del núcleo de un evaporador se sopla en el interior, el interior puede estar expuesto a un olor desagradable debido a los compuestos orgánicos volátiles producidas por los mohos y bacterias después de su uso durante mucho tiempo.

35

40

Después de su uso durante mucho tiempo, la superficie del núcleo de un evaporador está cubierta con una biopelícula, que consiste en bacterias, grupos de células y sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Las EPS incluyen varios componentes, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos poliurónicos, ácidos nucleicos, lípidos, etc. En la superficie del núcleo de un evaporador, proliferan diversas bacterias y mohos con la biopelícula como nutrientes y producen diversos compuestos orgánicos volátiles microbianos (MVOCs) como metabolitos, que se conocen como la causa del mal olor del aire acondicionado.

45

Aunque están disponibles comercialmente varios tipos de compuestos aromáticos para la eliminación de dicho olor desagradable, no eliminan fundamentalmente los mohos y bacterias que proliferan en el núcleo de un evaporador, sino que simplemente diluyen el olor desagradable temporalmente. Además, los agentes antibacterianos que están disponibles comercialmente en la actualidad no se han desarrollado para actuar específicamente en mohos o bacterias particulares que proliferan en el núcleo de un evaporador, sino que se utilizan porque se consideran que tienen efectos antibacterianos contra patógenos comunes.

50

Los inventores de la presente invención han dado a conocer en la publicación de patente coreana No. 10-2012-0020309 un procedimiento de fabricación de un núcleo de un evaporador recubierto con una biopelícula formada de microorganismos específicos que son inodoros o con fragancia para impedir la adhesión y el crecimiento de bacterias y mohos que causan un olor desagradable en el núcleo de un evaporador.

55

Sin embargo, no se identificó qué bacterias son tales microorganismos inodoros. Además, no se demostró claramente si pueden sobrevivir en el núcleo de un evaporador después de colocarse sobre el mismo y pueden impedir que habiten microorganismos que causan un olor desagradable y por lo tanto pueden evitar el olor desagradable.

60

El documento KR-A-20120020309 describe un procedimiento de fabricación de un núcleo de un evaporador que se ha recubierto con una biopelícula que comprende un microorganismo no especificado que es inodoro o con

65

fragancia, evitando de este modo la adhesión de otros microorganismos que causan olores desagradables.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA

5 Los inventores de la presente invención han hecho esfuerzos para encontrar un procedimiento para controlar eficazmente los microorganismos que causan un olor desagradable utilizando microorganismos inodoros. Como resultado, se han cribado con éxito 13 tipos de microorganismos que no causan un olor desagradable en un sistema de acondicionamiento de aire y han confirmado que, cuando se forma una biopelícula utilizando los mismos o una combinación de los mismos, el crecimiento de microorganismos que causan olores desagradables se puede prevenir y, por lo tanto, se puede prevenir el olor desagradable.

10 La presente invención está dirigida a proporcionar el uso de una composición para la prevención de olores de un sistema de acondicionamiento de aire, que contiene microorganismos inodoros, o un cultivo de los mismos.

15 La presente invención también está dirigida a proporcionar un núcleo de un evaporador recubierto con la composición para la prevención de olores.

20 La presente invención también está dirigida a proporcionar un procedimiento de fabricación de un núcleo de un evaporador inodoro que no causa olor en un sistema de acondicionamiento de aire, que incluye recubrir con la composición para prevenir olores un núcleo de un evaporador.

La presente invención también está dirigida a proporcionar un procedimiento para prevenir olores de un sistema de acondicionamiento de aire, que incluye recubrir con la composición para prevenir olores un núcleo de un evaporador.

25 La presente invención también está dirigida a proporcionar un procedimiento para comprobar los olores de un sistema de acondicionamiento de aire, que incluye recubrir con la composición para prevenir olores un núcleo de un evaporador, introducir combustibles derivados del petróleo o contaminantes del aire como nutrientes para los microorganismos contenidos en la composición y comprobar si se generan olores.

30 La presente invención también está dirigida a proporcionar microorganismos inodoros para el recubrimiento de un núcleo de un evaporador para la prevención de olores de un sistema de acondicionamiento de aire.

Otros propósitos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, dibujos y reivindicaciones.

35 En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de una composición para prevenir olores de un sistema de acondicionamiento de aire, que contiene microorganismos inodoros o un cultivo de los mismos.

40 Los inventores de la presente invención han hecho esfuerzos para encontrar un procedimiento para controlar eficazmente microorganismos que causan un olor desagradable utilizando microorganismos inodoros. En particular, se han esforzado en erradicar fundamentalmente la causa de los olores desagradables de un sistema de acondicionamiento de aire. Como resultado, se han cribado con éxito 13 tipos de microorganismos que no causan un olor desagradable en un sistema de acondicionamiento de aire y han confirmado que, cuando se forma una biopelícula usando los mismos o una combinación de los mismos, se puede evitar el crecimiento de microorganismos que causan un olor desagradable y, por lo tanto, se puede prevenir un olor desagradable.

50 En la presente invención, el término "sistema de acondicionamiento de aire" se refiere a un sistema que mantiene la temperatura, la humedad, la limpieza, el flujo, etc. del aire dentro de un espacio que está total o parcialmente aislado del ambiente externo. Como ejemplo preferido, el espacio aislado puede ser un espacio interior que está total o parcialmente aislado del exterior, tal como dentro de un edificio, vehículo, tren, barco, avión, etc. Como ejemplo preferido, el sistema de acondicionamiento de aire puede ser un aire acondicionado.

55 En un sistema de acondicionamiento de aire, todo el aire que ha pasado a través de un soplador pasa a un núcleo de un evaporador. En la superficie del núcleo de un evaporador, se crea un entorno favorable para el crecimiento de microorganismos a medida que continúa la condensación de agua debido a la diferencia de temperatura. Como resultado, se forma una biopelícula con el tiempo. Los microorganismos metabolizan diversas sustancias que flotan en el aire en el interior o exterior como nutrientes y producen diversos compuestos orgánicos volátiles micorbianos (MVOCs) como metabolitos que emiten mal olor.

60 La biopelícula es un grupo de microorganismos vivos encerrados en una membrana. La membrana protege los microorganismos del entorno externo y suministra nutrientes. La membrana se compone de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que incluyen diversos componentes, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos poliurónicos, ácidos nucleicos, lípidos, etc. En la superficie del núcleo de un evaporador, prolifera una variedad de microorganismos usándolos como nutrientes y se producen metabolitos que desprenden un olor desagradable.

65 Los inventores de la presente invención han cribado microorganismos que no causan un olor desagradable del

núcleo de un evaporador y, a través del cultivo, han aislado cepas dominantes que forman colonias de los microorganismos. Las cepas dominantes pueden aislarse y cultivarse de acuerdo con diversos procedimientos conocidos en la técnica relacionada y los microorganismos dominantes se pueden cribar, por ejemplo, en base a relaciones de dilución o características morfológicas, tales como el color, tamaño, forma, etc., de las colonias.

Los microorganismos dominantes incluyen *Methylobacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Deinococcus*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* o *Flavobacterium*, específicamente *Methylobacterium aquaticum*, *Methylobacterium brachiatum*, *Methylobacterium platani*, *Acinetobacter johnsonii*, *Bacillus vietnamensis*, *Brevibacillus invocatus*, *Deinococcus ficus*, *Leifsonia soli*, *Pseudomonas nitroreducens*, *Sphingomonas aquatilis*, *Methylobacterium komagatae*, *Deinococcus apachensis* o *Flavobacterium oceanosedimentum*.

Estos microorganismos se depositaron en el Centro Coreano de Cultivos de Microorganismos el 14 de noviembre de 2012 o 10 de diciembre de 2013 y se proporcionaron los números de acceso siguientes: *Methylobacterium aquaticum* HKMC-1 (número de acceso: KCCM11325P), *Methylobacterium brachiatum* HKMC-2 (número de acceso: KCCM11326P), *Methylobacterium platani* HKMC-3 (número de acceso: KCCM11327P), *Acinetobacter johnsonii* HKMC-4 (número de acceso: KCCM11328P), *Bacillus vietnamensis* HKMC-5 (número de acceso: KCCM11329P), *Brevibacillus invocatus* HKMC-6 (número de acceso: KCCM11330P), *Deinococcus ficus* HKMC-7 (número de acceso: KCCM11331P), *Leifsonia soli* HKMC-8 (número de acceso: KCCM11332P), *Pseudomonas nitroreducens* HKMC-9 (número de acceso: KCCM11333P), *Sphingomonas aquatilis* HKMC-10 (número de acceso: KCCM11334P), *Methylobacterium komagatae* HKMC-11 (número de acceso: KCCM11335P), *Deinococcus apachensis* HKMC-12 (número de acceso: KCCM11499P) y *Flavobacterium oceanosedimentum* HKMC-13 (número de acceso: KCCM11500P).

Los microorganismos pueden estar contenidos en la composición para la prevención de olores, ya sea solos o en combinación con otros microorganismos.

El uso de la composición para la prevención de olores en la presente invención impide que habiten microorganismos generadores de un olor desagradable y/o los olores desagradables generados por los mismos. Es decir, el uso de la composición en la presente invención impide que habiten microorganismos generadores de un olor desagradable cuando dicha composición recubre o se pulveriza sobre todas o partes específicas de un aparato generador de olor desagradable, que de acuerdo con la presente invención es un sistema de acondicionamiento de aire.

La composición usada en la presente invención para la prevención de olores puede contener adicionalmente diversos componentes del medio conocidos en la técnica relacionada para mejorar la formación de biopelículas en los diferentes objetos. Los componentes del medio pueden incluir, por ejemplo, agar, gelatina, alginato, carragenina o pectina. Específicamente, se pueden usar medio PTYG, medio R2A o medio LB para un núcleo de un evaporador en un sistema de acondicionamiento de aire.

La composición usada en la presente invención para la prevención de olores puede contener adicionalmente, además de los microorganismos inodoros, un aromático, un esterilizador, un agente antimicrobiano, etc., para evitar los olores desagradables o para prevenir o eliminar los microorganismos generadores de olor desagradables.

Según la presente invención, el uso de la composición en la presente invención es para la prevención de olores de un sistema de acondicionamiento de aire.

El sistema de acondicionamiento de aire a la que dicha composición es aplicable puede instalarse en edificios, vehículos, trenes, barcos, aviones, etc., para el propósito de acondicionamiento de la temperatura, humedad, flujo o limpieza del aire.

La biopelícula, tal como se describe anteriormente, puede recubrir un sistema de acondicionamiento de aire. El sistema de acondicionamiento de aire incluye un compresor, un soplador, un núcleo de un evaporador, etc. Específicamente, la biopelícula descrita anteriormente puede recubrir un núcleo de un evaporador.

Específicamente, se crea un entorno favorable para la presencia y la proliferación de microorganismos en la superficie del núcleo de un evaporador en el sistema de acondicionamiento de aire debido a intercambio de calor del aire. Con el tiempo, los microorganismos que se adhieren en la superficie forman una biopelícula estable que es difícil de eliminar. Es decir, los microorganismos inodoros pueden proliferar con antelación, de manera que se puede evitar la presencia de microorganismos generadores de olores desagradables.

Los inventores de la presente invención han descubierto que puede formarse en el núcleo de un evaporador una biopelícula que consiste solamente en microorganismos inodoros que son la especie dominante o tienen una viabilidad superior mediante su recubrimiento con antelación sobre el núcleo de un evaporador del sistema de acondicionamiento de aire y, por lo tanto, se pueden prevenir de manera significativa olores desagradables y la proliferación y presencia de otros microorganismos generadores de olor desagradables (Ejemplos 9-14).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un núcleo de un evaporador recubierto con la composición para

prevenir olores y un procedimiento para fabricar el mismo.

Una aleta del núcleo de un evaporador puede fabricarse de aluminio o de una aleación de aluminio, y el núcleo de un evaporador se fabrica utilizando aluminio tratado con antibacteriano o una aleación de aluminio no tratada con antibacteriano. Sin embargo, el material del núcleo de un evaporador no se limita al aluminio o la aleación de aluminio. En general, el núcleo de un evaporador puede fabricarse de cualquier metal que tenga una buena conductividad térmica y una excelente resistencia a la corrosión, tal como cobre, además del aluminio o de una aleación del mismo. En un vehículo eléctrico, por ejemplo, se puede acoplar un intercambiador de calor con un dispositivo de Peltier. De esta manera, puede utilizarse cualquier material siempre que se pueda conseguir una estructura que permita fácilmente el intercambio de calor.

La composición para la prevención de olores que contienen microorganismos inodoros, o un cultivo de los mismos, puede recubrir el núcleo de un evaporador de acuerdo con diversos procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, pulverización, recubrimiento, inmersión). Preferiblemente, el núcleo de un evaporador se puede sumergir en un cultivo de los microorganismos inodoros de manera que los microorganismos inodoros pueden recubrir de manera uniforme la aleta en el interior del núcleo de un evaporador. El recubrimiento puede llevarse a cabo de una vez o en varias veces.

El cultivo de los microorganismos inodoros puede tener una densidad óptica (D.O.) de 0,3-0,9, más preferiblemente 0,4-0,8.

Cuando se utiliza el cultivo de microorganismos que tiene un valor de D.O. de 0,3-0,9, los microorganismos pueden recubrir a una concentración de 10^4 - 10^8 UFC/g. Y, cuando se utiliza el cultivo de microorganismos que tiene un valor D.O. de 0,4-0,89, los microorganismos pueden recubrir a una concentración de 10^5 - 10^7 UFC/g. Teniendo en cuenta que la concentración de microorganismos presentes en el núcleo de un evaporador en un vehículo usado es de aproximadamente 10^6 UFC/g, los microorganismos pueden recubrir preferiblemente a una concentración de 10^5 - 10^7 UFC/g usando un cultivo de microorganismos que tiene un valor de D.O. de 0,4-0,8.

Los microorganismos inodoros recubiertos pueden formar una biopelícula que es estable durante un tiempo largo (30 días o más, 60 días o más o 90 días o más) al distribuirse uniformemente sobre y estar presentes en la superficie del núcleo de un evaporador (Ejemplos 11-13).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para prevenir los olores de un sistema de acondicionamiento de aire, que incluye: recubrir con la composición para prevenir olores un núcleo de un evaporador.

Los inventores de la presente invención han llevado a cabo experimentos después de instalar un soporte en un techo del vehículo y a continuación montar el núcleo de un evaporador recubierto con la composición de la presente invención sobre el mismo con el fin de investigar si el núcleo de un evaporador puede mantener la población de microorganismos inodoros bajo una condición al aire libre y evitar la presencia de otros microorganismos generadores de olor desagradables. Como resultado, se encontró que la población inicialmente recubierta de los microorganismos inodoros se mantuvo durante 60 días y no se detectaron microorganismos exógenos que pueden generar olores desagradables (Ejemplo 14).

Por consiguiente, cuando se forma una biopelícula mediante el recubrimiento con la composición para la prevención de olores que contienen microorganismos inodoros de la presente invención, se pueden prevenir de manera significativa el flujo de entrada y la presencia de microorganismos exógenos que puedan generar olores desagradables y, por lo tanto, se pueden prevenir con eficacia los olores desagradables de un aire acondicionado sistema.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para comprobar los olores de un sistema de acondicionamiento de aire, que incluye recubrir con la composición para prevenir olores un núcleo de un evaporador, introducir combustibles derivados del petróleo o los contaminantes del aire como nutrientes para los microorganismos contenidos en la composición y comprobar si se generan olores.

Si los microorganismos contenidos en la composición para la prevención de olores en realidad generan olores puede depender de los componentes de la fuente de nutrición que los microorganismos metabolizan. Por lo tanto, es importante que los microorganismos no generen olores cuando se suministran fuentes de nutrición en los sectores industriales relacionados.

En el caso de un sistema de acondicionamiento de aire, los microorganismos metabolizan diversas sustancias que flotan en el aire en interiores y exteriores como nutrientes. Es decir, los contaminantes del aire interior o exterior o componentes de los gases de escape (combustibles derivados del petróleo, tales como gasolina, aceite diesel, LPG, etc.) son las fuentes de nutrición de los microorganismos. Según la presente invención, se comprueba si se generan olores a partir de un sistema de acondicionamiento de aire en el entorno industrial real mediante la introducción de estas fuentes de nutrición al núcleo de un evaporador recubierto con los microorganismos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona *Methylobacterium aquaticum* HKMC-1 (número de acceso: KCCM11325P), *Methylobacterium brachiatum* HKMC-2 (número de acceso: KCCM11326P), *Methylobacterium platani* HKMC-3 (número de acceso: KCCM11327P), *Acinetobacter johnsonii* HKMC-4 (número de acceso: KCCM11328P), *Bacillus vietnamensis* HKMC-5 (número de acceso: KCCM11329P), *Brevibacillus invocatus* HKMC-6 (número de acceso: KCCM11330P), *Deinococcus ficus* HKMC-7 (número de acceso: KCCM11331P), *Leifsonia soli* HKMC-8 (número de acceso: KCCM11332P), *Pseudomonas nitroreducens* HKMC-9 (número de acceso: KCCM11333P), *Sphingomonas aquatilis* HKMC-10 (número de acceso: KCCM11334P), *Methylobacterium komagatae* HKMC-11 (número de acceso: KCCM11335P), *Deinococcus apachensis* HKMC-12 (número de acceso: KCCM11499P) o *Flavobacterium oceanosedimentum* HKMC-13 (número de acceso: KCCM11500P) como microorganismos para el recubrimiento de un núcleo de un evaporador para evitar los olores de un sistema de acondicionamiento de aire.

Estos microorganismos pueden ser utilizados para el recubrimiento de un núcleo de un evaporador para evitar los olores de un sistema de acondicionamiento de aire, ya sea solos o en combinación.

Las características y ventajas de la presente descripción se pueden resumir de la siguiente manera:

- (i) La presente invención proporciona el uso de una composición para prevenir olores de un sistema de acondicionamiento de aire, que contiene microorganismos inodoros o un cultivo de los mismos.
- (ii) La presente invención proporciona también un núcleo de un evaporador que está recubierto con la composición para la prevención de olores de un sistema de acondicionamiento de aire y un procedimiento para fabricar el mismo.
- (iii) Además, la presente invención proporciona un procedimiento para prevenir los olores de un sistema de acondicionamiento de aire, que incluye recubrir con la composición para prevenir olores un núcleo de un evaporador.
- (iv) Además, la presente invención proporciona un procedimiento para el control de olores de un sistema de acondicionamiento de aire, que incluye recubrir con la composición para prevenir olores un núcleo de un evaporador, introducir combustibles derivados del petróleo o contaminantes del aire como nutrientes para los microorganismos contenidos en la composición y comprobar si se generan olores.
- (v) Cuando se forma una biopelícula mediante el recubrimiento con la composición para la prevención de olores de la presente invención de un objeto en que habitan microorganismos generadores de olores desagradables, se pueden prevenir los olores desagradables eficazmente previniendo significativamente el flujo de entrada y la presencia de los microorganismos exógenos generadores de olores desagradables.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La figura 1 muestra una placa de Petri en la que se sumerge una aleta de aluminio esterilizada en un medio nutriente para la inoculación con microorganismos inodoros.
- La figura 2 muestra la población de las colonias de diferentes colores para una combinación 1 en la evaluación de la supervivencia durante 30 días.
- La figura 3 muestra la relación de las colonias de diferentes colores para una combinación 1 en la evaluación de la supervivencia durante 30 días.
- La figura 4 muestra la relación de las cepas para una combinación 1 en la evaluación de la supervivencia durante 30 días medida mediante REP-PCR.
- La figura 5 muestra la relación de las cepas para una combinación 2 en la evaluación de la supervivencia durante 30 días medida mediante REP-PCR.
- La figura 6 muestra la relación de las cepas para una combinación 3 en la evaluación de la supervivencia durante 30 días medida mediante REP-PCR.
- La figura 7 muestra la relación de las cepas de *Methylobacterium* sp. para una combinación 3 en la evaluación de la supervivencia durante 30 días medida mediante REP-PCR.
- La figura 8 muestra la relación de las cepas para una combinación 4 en la evaluación de la supervivencia durante 30 días medida mediante REP-PCR.
- La figura 9 muestra la relación de las cepas para una combinación 5 en la evaluación de la supervivencia durante 30 días medida mediante REP-PCR.
- La figura 10 muestra la relación de las cepas para una combinación A en la evaluación de la supervivencia durante 30 días medida mediante REP-PCR.
- La figura 11 muestra la relación de las cepas para una combinación B en la evaluación de la supervivencia durante 30 días medida mediante REP-PCR.
- La figura 12 muestra la relación de las cepas para una combinación C en la evaluación de la supervivencia durante 30 días medida mediante REP-PCR.
- La figura 13 muestra la relación de las cepas para una combinación D en la evaluación de la supervivencia durante 30 días medida mediante REP-PCR.
- La figura 14 muestra la relación de las cepas para una combinación E en la evaluación de la supervivencia durante 30 días medida mediante REP-PCR.
- La figura 15 muestra la relación de las cepas para una combinación F en la evaluación de la supervivencia durante 30 días medida mediante REP-PCR.
- La figura 16 muestra la población de una combinación de *Methylobacterium aquaticum* y *Methylobacterium*

komagatae en la evaluación de la supervivencia durante 90 días.

La figura 17 muestra la relación de las cepas para una combinación de *Methylobacterium aquaticum* y *Methylobacterium komagatae* en la evaluación de la supervivencia durante 90 días medida mediante REP-PCR.

5 La figura 18 muestra la población de una combinación de *Methylobacterium aquaticum* y *Methylobacterium komagatae* en un soporte.

La figura 19 muestra el cambio en la población de una combinación de *Methylobacterium aquaticum* y *Methylobacterium komagatae* en un soporte medido mediante REP-PCR.

10 **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en más detalle a través de ejemplos. Los siguientes ejemplos son para fines ilustrativos solamente y serán evidentes para aquellos con conocimientos comunes en la técnica relacionada que el alcance de esta invención no está limitada por los ejemplos.

15 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1: Vehículos utilizados que emiten olores desagradables

Tabla 1

No	Vehículo	Tipo de muestra
1	Vehículo A	Núcleo de un evaporador
2	Vehículo B	Núcleo de un evaporador
3	Vehículo C	Núcleo de un evaporador
4	Vehículo D	Núcleo de un evaporador
5	Vehículo E	Núcleo de un evaporador

20 Las muestras de núcleo de un evaporador se tomaron de los núcleos evaporadores montados en 5 vehículos usados (vehículos A-E) que emiten olores desagradables.

25 **Ejemplo 2: Preparación de muestras de núcleo de un evaporador**

Las muestras de núcleo de un evaporador tomadas de los núcleos evaporadores de los vehículos utilizados A-E se almacenaron en bolsas de polietileno selladas a 4°C hasta su uso. Para el aislamiento y el cultivo de los microorganismos, se tomaron 5 g de muestras de aleta de cada núcleo de un evaporador en varias partes, incluyendo partes delantera y trasera, utilizando alicates de punta larga esterilizados y a continuación se mezclaron antes de su uso.

30 **Ejemplo 3: Separación de microorganismos de núcleos evaporadores**

Los microorganismos se separaron de los núcleos de los evaporadores de la siguiente manera.

- 35 ① Las muestras tomadas del núcleo de un evaporador se mezclaron y se pusieron en un mezclador.
 ② Se añadieron 200 ml de 1x solución salina tamponada con fosfato (PBS) esterilizada al mezclador.
 ③ Las muestras mezcladas y la PBS se mezclaron durante 30 segundos.
 ④ El mezclador se dejó en hielo durante 1 minuto.
 ⑤ Las etapas ③ y ④ se repitieron 2 veces más.
 40 ⑥ La suspensión resultante se centrifugó a 4°C durante 3 minutos a 13.000 rpm.
 ⑦ Sólo se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo.
 ⑧ La superficie del núcleo de un evaporador de la que se tomaron las muestras se limpió varias veces con un hisopo de algodón esterilizado empapado con el sobrenadante.
 ⑨ La cabeza del hisopo de algodón se puso en el sobrenadante y a continuación se agitó con vórtice.
 45 ⑩ El precipitado obtenido en la etapa ⑥ y la mezcla obtenida en el ⑨ se mezclaron y se utilizaron como una solución de inoculación.

Los microorganismos se separaron físicamente de los núcleos de los evaporadores de los vehículos A-E a través de las etapas ①-⑩.

50 **Ejemplo 4: Aislamiento y cultivo de microorganismos**

Se aislaron bacterias heterótrofas aeróbicas, generalmente llamadas bacterias normales, del aire acondicionado mediante el cultivo en una placa heterotrófica. Se utilizaron medio de agar PTYG y medio de agar R2A como medios nutritivos complejos para aislar las bacterias normales. El medio de agar PTYG se preparó añadiendo 0,25 g de peptona (Difco), 0,25 g de triptona (Difco), 0,5 g de extracto de levadura (Difco), 0,5 g de glucosa (Difco), 30 mg de MgSO₄ (Sigma), 3 mg de CaCl₂ (Sigma) y 15 g de agar Bacto (Difco) a 980 ml de agua destilada y esterilizando a 121°C durante 15 minutos bajo alta presión después de ajustar el pH a 7,0. El medio de agar R2A se preparó

añadiendo 0,5 g de extracto de levadura (Difco), 0,5 g de proteosa peptona No. 3 (Difco), 0,5 g de casaminoácidos (Difco), 0,5 g de dextrosa (Difco), 0,5 g de almidón soluble (Difco), 0,3 g de piruvato de sodio (Difco), 0,3 g de sulfato de dipotasio (Difco), 0,05 g de sulfato de magnesio (Difco) y 15 g de agar Bacto (Difco) a 980 ml de agua destilada y esterilizando a 121°C durante 15 minutos bajo alta presión después de ajustar el pH a 7,2. Se utilizaron tres tipos de antibióticos (Tabla 2) para aislar las bacterias normales no dominantes. Cada antibiótico se inoculó a aproximadamente 50°C después de esterilizar en filtro el medio hasta una concentración de 100 ppm.

Tabla 2

No.	Antibiótico	Tipo	Fabricante
1	Kanamicina	Aminoglicósido	Sigma
2	Ampicilina	beta-lactama	Sigma
3	Cloramfenicol	Cloramfenicol	Sigma

Ejemplo 5: Aislamiento y cultivo de hongos (mohos)

Se aislaron hongos (mohos) del aparato de aire acondicionado mediante el cultivo en una placa aeróbica utilizando medios nutrientes. Se utilizaron medio agar de dextrosa y patata y medio agar de extracto de malta para aislar los hongos (mohos). El medio de agar de dextrosa y patata se preparó añadiendo 4 g de almidón de patata (Difco), 20 g de dextrosa (Difco) y 15 g de agar Bacto (Difco) a 980 ml de agua destilada y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos bajo alta presión después de ajustar el pH a 5,1. El medio de agar de extracto de malta se preparó añadiendo 20 g de extracto de malta (Difco) y 15 g (Difco) de agar Bacto a 980 ml de agua destilada y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos bajo alta presión después de ajustar el pH a 5,0.

Se utilizó una placa de Petri de 90 mm x 15 mm para el cultivo de los hongos y los hongos cultivados se aislaron utilizando una placa de Petri de 60 mm x 15 mm.

Ejemplo 6: Aislamiento y cultivo de cepas dominantes

Las cepas dominantes se aislaron y cultivaron en base a relaciones de dilución o características morfológicas, tales como el color, tamaño, forma, etc., de las colonias de la siguiente manera.

- ① Los mohos y bacterias se separaron del medio de cultivo.
- ② Las bacterias que muestran diferentes morfologías se separaron mediante la inoculación a medios complejos utilizando un bucle.
- ③ A partir de los medios inoculados, se seleccionó y se subcultivó el cultivo bacteriano que muestra el mejor crecimiento.
- ④ Los moldes se inocularon a medios complejos después de la eliminación de las porciones de extremos de hifa utilizando un bisturí.
- ⑤ A partir de los medios inoculados, se seleccionó y se subcultivó el cultivo de moho que muestra el mejor crecimiento.

Ejemplo 7: Caracterización genética de las bacterias dominantes

Huellas dactilares basadas en el análisis de los patrones de REP-PCR

REP-PCR es una técnica de huellas dactilares biológicas moleculares para el análisis estructural de cromosomas bacterianos que permite la distinción de diferentes cepas bacterianas. a caracterización genética se llevó a cabo mediante REP-PCR de la siguiente manera.

(1) Lisis celular

- ① Se añadieron 2,5 µl de un reactivo de PCR Lyse-N-Go (Thermo) a un tubo de PCR.
- ② Se pipeteó una colonia sobre el tubo en un banco limpio. Durante el pipeteo, se tuvo cautela de tal manera que la solución resultante no llegó a ser turbia.
- ③ El cultivo se llevó a cabo en una máquina de PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- ④ La lisis celular se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de lisis descrito en la Tabla 3. En el ciclo noveno, la temperatura se mantuvo a 80°C.

Tabla 3

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)
1	65	30
2	8	30
3	65	90

4	97	180
5	8	60
6	65	180
7	97	60
8	65	60
9	80	mantener

(2) Reacción de PCR

5 Utilizando un reactivo de PCR preparado, tal como se describe en la Tabla 4, se llevó a cabo la amplificación por PCR mediante la realización de predesnaturalización a 94°C durante 7 minutos y la repetición de 33 ciclos de desnaturalización a 92°C durante 1 minuto, hibridación a 51,5°C durante 1 minuto y extensión a 65°C durante 8 minutos, tal como se describe en la Tabla 5.

Tabla 4

10

①	dNTP (2,5 mM cada uno)	12,5 µL
②	tampón Gitschier	5,0 µL
③	DMSO (100%)	2,5 µL
④	Autoclaved 3° DW	0,3 µL
⑤	cebador BOXA1R (50 pmol/µl)	1,0 µL
5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG		
⑥	BSA (10 mg/ml)	0,4 µL
⑦	ADN bacteriano	2,5 µL
⑧	Taq polimerasa (Roche) (5 U/µl)	0,8 µl

Tabla 5

Etapas 1	94°C	7 min
Etapas 2	92°C	1 min
Etapas 3	51,5°C	1 min
Etapas 4	65°C	8 min
Etapas 2, 3, 4: 33 ciclos adicionales		
Etapas 6	65°C	16 min
Etapas 7	4°C	mantener

15 **(3) Electroforesis en gel**

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR se cargaron en gel de agarosa al 1,2-1,5% suplementado con EtBr después de mezclar un colorante 6x con la muestra en una proporción de 1:5. Como la mayoría de productos de PCR estaban en el intervalo de 100-1000 pb, se cargaron más firmemente con escaleras de 100 pb. A continuación, la electroforesis se llevó a cabo lo más lentamente posible (50 V) de tal manera que los colorantes de azul de bromofenol y xileno cianol se movieron a medio camino de todo el gel. Las cepas que exhiben el mismo patrón de ADN en el gel fueron considerados como las mismas cepas.

20

25 **(4) Aislamiento de bacterias dominantes basado en el análisis de genes ARNr 16S**

Los genes de ácidos ribonucleicos ribosomales (ARNr) se utilizan para la identificación genética de bacterias. Las bacterias diferenciadas por REP-PCR pueden ser identificados de ese modo en los niveles de género y especie. El ARNr 16S es un ARN que constituye un ribosoma mediante la interacción con diversas proteínas. Dado que las secuencias completas o secuencias de bases de oligonucleótidos son conocidos para más de 2000 especies de bacterias, las bacterias se pueden agrupar en base a la similitud del gen de ARNr 16S. Debido a que la diferencia en la secuencia de bases del gen de ARNr 16S es mucho menor que las de las secuencias de bases de otros genes en el genoma, la similitud de la secuencia de bases de ARNr 16S se considera como una medida de la distancia evolutiva entre organismos. La identificación de los microorganismos, en particular, los microorganismos industrialmente útiles, en base a la similitud de la secuencia de bases de fragmentos de genes de ARNr 16S, se ha utilizado como un procedimiento de identificación típico junto con el análisis de ácidos grasos y la obtención de perfiles de asimilación de carbohidratos.

30

35

<PCR de ARNr 16S>

40 Condiciones de PCR (en total 50 µl): se añadió una mezcla (44,5 µl) de las soluciones descritas en la Tabla 6, a excepción de ADN y Taq, a la solución de lisis descrita anteriormente. Posteriormente, la amplificación por PCR se

llevó a cabo mediante la realización de predesnaturalización a 94°C durante 5 minutos y la repetición de 29 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto y 30 segundos, tal como se describe en la Tabla 7.

5

Tabla 6

Autoclave 3° DW	22 µl
10x tampón (Roche)	5 µl
dNTP (Roche, 2,5 mM)	5 µl
DMSO	5 µl
BSA (10 mg/ml)	2,5 µl
27 mf (20 pmol/µl)	2,5 µl
1492r (20 pmol/µl)	2,5 µl
ADN	5 µl
Taq (Roche)	0,5 µl

Tabla 7

Etapa 1	94°C	5 min
Etapa 2	94°C	1 min
Etapa 3	55°C	1 min
Etapa 4	72°C	1 min 30 s
Ir a la etapa 2: 29 ciclos adicionales		
Etapa 6	72°C	10 min
Etapa 7	4°C	mantener

10

(5) Purificación por PCR

Los productos de PCR ARNr 16S se purificaron usando un kit de purificación QIAquick PCR.

- ① Los productos de PCR se añadieron a un tampón 5x PB.
- ② La solución resultante se transfirió a una columna QIAquick.
- ③ Para la unión de ADN, la solución se centrifugó durante 1 minuto.
- ④ Para el lavado, se añadieron 750 µl de tampón PE a la columna QIAquick y la centrifugación se realizó durante 1 minuto.
- ⑤ La centrifugación se realizó durante 1 minuto.
- ⑥ La solución resultante se transfirió a una columna QIAquick fresca.
- ⑦ Para la extracción de DNA, se añadieron 30 µl de tampón EB y la solución resultante se dejó reposar durante 1 minuto.
- ⑧ Después de realizar la centrifugación durante 1 minuto, se recogió el ADN disuelto en EB en un tubo.

(6) Microorganismos aislados y características de los mismos

<Microorganismo 1>

- 1. Nombre del microorganismo: HKMC-1
 - Género: *Methylobacterium*
 - Especie: *aquaticum*
 - Número de acceso: KCCM11325P (14/11/2012)
- 2. Condiciones de reconstitución.
 - a. Agente de reconstitución
 - (1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.
 - (2) pH: 7,0
 - (3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C
 - b. Cultivo a 28°C durante 7 días
- 3. Medio
 - (1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.
 - (2) pH: 7,0
 - (3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

4. Condiciones de cultivo.
a. Aeróbico/anaeróbico: aeróbico
b. Temperatura: 28°C
c. Cultivo con o sin agitación (líquido o sólido)

5

5. Condiciones de almacenamiento
Temperatura: -70°C

<Microorganismo 2>

10

1. Nombre del microorganismo: HKMC-2
Género: *Methylobacterium*
Especie: *brachiatum*
Número de acceso: KCCM11326P (14/11/2012)

15

2. Condiciones de reconstitución.
a. Agente de reconstitución
(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.
(2) pH: 7,0
(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C
b. Cultivo a 28°C durante 7 días

20

3. Medio

- (1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.
(2) pH: 7,0
(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

25

4. Condiciones de cultivo.
a. Aeróbico/anaeróbico: aeróbico
b. Temperatura: 28°C
c. Cultivo con o sin agitación (líquido o sólido)

30

5. Condiciones de almacenamiento
Temperatura: -70°C

35

<Microorganismo 3>

1. Nombre del microorganismo: HKMC-3
Género: *Methylobacterium*
Especie: *platani*
Número de acceso: KCCM11327P (14/11/2012)

40

2. Condiciones de reconstitución.
a. Agente de reconstitución
(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.
(2) pH: 7,0
(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C
b. Cultivo a 28°C durante 7 días

45

3. Medio

- (1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.
(2) pH: 7,0
(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

55

4. Condiciones de cultivo.
a. Aeróbico/anaeróbico: aeróbico
b. Temperatura: 28°C
c. Cultivo con o sin agitación (líquido o sólido)

60

5. Condiciones de almacenamiento
Temperatura: -70°C

65

<Microorganismo 4>

1. Nombre del microorganismo: HKMC-4

Género: *Acinetobacter*

Especie: *johnsonii*

Número de acceso: KCCM11328P (14/11/2012)

2. Condiciones de reconstitución.

a. Agente de reconstitución

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

b. Cultivo a 28°C durante 7 días

3. Medio

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

4. Condiciones de cultivo.

a. Aeróbico/anaeróbico: aeróbico

b. Temperatura: 28°C

c. Cultivo con o sin agitación (líquido o sólido)

5. Condiciones de almacenamiento

Temperatura: -70°C

<Microorganismo 5>

1. Nombre del microorganismo: HKMC-5

Género: *Bacillus*

Especie: *vietnamensis*

Número de acceso: KCCM11329P (14/11/2012)

2. Condiciones de reconstitución.

a. Agente de reconstitución

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

b. Cultivo a 28°C durante 7 días

3. Medio

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

4. Condiciones de cultivo.

a. Aeróbico/anaeróbico: aeróbico

b. Temperatura: 28°C

c. Cultivo con o sin agitación (líquido o sólido)

5. Condiciones de almacenamiento

Temperatura: -70°C

<Microorganismo 6>

1. Nombre del microorganismo: HKMC-6

Género: *Brevibacillus*

Especie: *invocatus*

Número de acceso: KCCM11330P (14/11/2012)

2. Condiciones de reconstitución.

a. Agente de reconstitución

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

b. Cultivo a 28°C durante 7 días

3. Medio

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

4. Condiciones de cultivo.

a. Aeróbico/anaeróbico: aeróbico

b. Temperatura: 28°C

c. Cultivo con o sin agitación (líquido o sólido)

5. Condiciones de almacenamiento

Temperatura: -70°C

<Microorganismo 7>

1. Nombre del microorganismo: HKMC-7

Género: *Deinococcus*

Especie: *ficus*

Número de acceso: KCCM11341P (14/11/2012)

2. Condiciones de reconstitución.

a. Agente de reconstitución

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

b. Cultivo a 28°C durante 7 días

3. Medio

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

4. Condiciones de cultivo.

a. Aeróbico/anaeróbico: aeróbico

b. Temperatura: 28°C

c. Cultivo con o sin agitación (líquido o sólido)

5. Condiciones de almacenamiento

Temperatura: -70°C

<Microorganismo 8>

1. Nombre del microorganismo: HKMC-8

Género: *Leifsonia*

Especie: *solii*

Número de acceso: KCCM11332P (14/11/2012)

2. Condiciones de reconstitución.

a. Agente de reconstitución

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

b. Cultivo a 28°C durante 7 días

3. Medio

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

5

4. Condiciones de cultivo.

a. Aeróbico/anaeróbico: aeróbico

b. Temperatura: 28°C

c. Cultivo con o sin agitación (líquido o sólido)

10

5. Condiciones de almacenamiento

Temperatura: -70°C

<Microorganismo 9>

15

1. Nombre del microorganismo: HKMC-9

Género: *Pseudomonas*

Especie: *nitroreducens*

Número de acceso: KCCM11333P (14/11/2012)

20

2. Condiciones de reconstitución.

a. Agente de reconstitución

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

25

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

b. Cultivo a 28°C durante 7 días

3. Medio

30

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

35

4. Condiciones de cultivo.

a. Aeróbico/anaeróbico: aeróbico

b. Temperatura: 28°C

c. Cultivo con o sin agitación (líquido o sólido)

40

5. Condiciones de almacenamiento

Temperatura: -70°C

<Microorganismo 10>

45

1. Nombre del microorganismo: HKMC-10

Género: *Sphingomonas*

Especie: *aquatilis*

Número de acceso: KCCM11334P (14/11/2012)

50

2. Condiciones de reconstitución.

a. Agente de reconstitución

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

55

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

b. Cultivo a 28°C durante 7 días

3. Medio

60

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

65

4. Condiciones de cultivo.

a. Aeróbico/anaeróbico: aeróbico

b. Temperatura: 28°C

c. Cultivo con o sin agitación (líquido o sólido)

5. Condiciones de almacenamiento
Temperatura: -70°C

5

<Microorganismo 11>

1. Nombre del microorganismo: HKMC-11
Género: *Methylobacterium*
Especie: *komagatae*
Número de acceso: KCCM11335P (14/11/2012)

10

2. Condiciones de reconstitución.

a. Agente de reconstitución

15

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

b. Cultivo a 28°C durante 7 días

20

3. Medio

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

25

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

4. Condiciones de cultivo.

a. Aeróbico/anaeróbico: aeróbico

b. Temperatura: 28°C

30

c. Cultivo con o sin agitación (líquido o sólido)

5. Condiciones de almacenamiento
Temperatura: -70°C

35

<Microorganismo 12>

1. Nombre del microorganismo: HKMC-12
Género: *Deinococcus*
Especie: *apachensis*
Número de acceso: KCCM11499P (10/12/2013)

40

2. Condiciones de reconstitución.

a. Agente de reconstitución

45

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

b. Cultivo a 28°C durante 7 días

50

3. Medio

(1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.

(2) pH: 7,0

55

(3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C

4. Condiciones de cultivo.

a. Aeróbico/anaeróbico: aeróbico

b. Temperatura: 28°C

60

c. Cultivo con o sin agitación (líquido o sólido)

5. Condiciones de almacenamiento
Temperatura: -70°C

65

<Microorganismo 13>

1. Nombre del microorganismo: HKMC-13

65

Género: *Flavobacterium*
 Especie: *oceanosedimentum*
 Número de acceso: KCCM11500P (10/12/2013)

- 5 2. Condiciones de reconstitución.
 a. Agente de reconstitución
 (1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.
 (2) pH: 7,0
 10 (3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C
 b. Cultivo a 28°C durante 7 días
3. Medio
 (1) Composición: medio PTYG (por 1 litro de medio, 0,25 g de peptona, 0,25 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de glucosa, 30 mg de MgSO₄ y 3 mg de CaCl₂) o medio R2A.
 (2) pH: 7,0
 15 (3) Condiciones de esterilización: 20 minutos a 121°C
4. Condiciones de cultivo.
 a. Aeróbico/anaeróbico: aeróbico
 b. Temperatura: 28°C
 c. Cultivo con o sin agitación (líquido o sólido)
5. Condiciones de almacenamiento
 25 Temperatura: -70°C

Ejemplo 8: Evaluación sensorial de los microorganismos aislados en aleta de aluminio

(1) Cultivo en un medio nutriente

30 Para la evaluación sensorial de 11 especies de entre los microorganismos identificados en el Ejemplo 7, los microorganismos se cultivaron en medios nutrientes a 28°C durante 7 días. El procedimiento de cultivo de las bacterias en medios nutrientes fue de la siguiente manera.

- 35 ① Los microorganismos aislados se inocularon en un medio nutriente líquido.
 ② El cultivo se realizó a 28°C durante 5-7 días.
 ③ Se inocularon 100 µl de las bacterias cultivadas en el medio líquido a un medio nutriente sólido.
 ④ Las bacterias inoculadas se distribuyeron de manera uniforme utilizando un esparcidor.
 ⑤ Las bacterias se cultivaron en una placa de Petri sellada a 28°C durante 10 días.

(2) Evaluación sensorial en la aleta de aluminio

Se esterilizó una aleta de aluminio rectangular y, a continuación, se sumergió en un medio nutriente. Para la inoculación bacteriana, el cultivo se llevó a cabo en el medio nutriente en las mismas condiciones de las etapas ②-④. El resultado de la evaluación sensorial se proporciona en la Tabla 8.

- 45 ① Aleta de aluminio tratada con antimicrobianos: Se utilizó un producto de núcleo de un evaporador recubierto con antimicrobiano comercialmente disponible.
 ② Aleta de aluminio con recubrimiento hidrófilo no tratado con antimicrobiano: Una aleta de aluminio que estaba recubierta con recubrimiento hidrófilo únicamente, sin recubrimiento antimicrobiano, se fabricó especialmente para la comparación con la aleta recubierta con antibacteriano. Aunque el núcleo de un evaporador fue fabricado a partir de aluminio para reducir el peso, también se puede fabricar de otros metales, tales como cobre, acero inoxidable, etc.

Tabla 8

No.	Aleta tratada con antimicrobiano	Aleta no tratada con antimicrobiano	Cepa
1	Inodora	Inodora	<i>Methylobacterium aquaticum</i> HKMC-1
2	Inodora	Inodora	<i>Methylobacterium brachiatum</i> HKMC-2
3	Inodora	Inodora	<i>Methylobacterium platani</i> HKMC-3
4	Inodora	Inodora	<i>Acinetobacter johnsonii</i> HKMC-4
5	Inodora	Inodora	<i>Bacillus vietnamensis</i> HKMC-5
6	Inodora	Inodora	<i>Brevibacillus invocatus</i> HKMC-6
7	Inodora	Inodora	<i>Deinococcus ficus</i> HKMC-7
8	Inodora	Inodora	<i>Leifsonia soli</i> HKMC-8

9	Inodora	Inodora	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> HKMC-9
10	Inodora	Inodora	<i>Sphingomonas aquatilis</i> HKMC -10
11	Inodora	Inodora	<i>Methylobacterium komagatae</i> HKMC-11

Ningún olor fue detectable para las 11 especies de microorganismos cuando se cultivaron después de la inoculación sobre la aleta de aluminio tratada con antimicrobiano y la aleta no tratada con antimicrobiano.

5 **Ejemplo 9: Evaluación de las condiciones óptimas para el recubrimiento con microorganismos inodoros**

(1) Análisis de la concentración óptima para el recubrimiento con microorganismos inodoros sobre la aleta

Para el recubrimiento de las 11 especies de microorganismos inodoros sobre un núcleo de un evaporador, se investigó la concentración de recubrimiento óptima para la inoculación de los microorganismos hasta una concentración de aproximadamente 10^6 UFC/g, tal como se describe en la solicitud de prioridad de 2012. *Methylobacterium aquaticum* se cultivó a 28°C hasta la fase log tardía y a continuación se cultivó a 4°C durante 18 horas después de lavar con solución salina al 0,85% esterilizada. Después del cultivo a 4°C, se midió que la densidad óptica (D.O.) fue de 0,749, 0,588, 0,55, 0,5 y 0,45. Se recubrieron 2 g de una aleta en forma de U con el cultivo mediante inmersión durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación a rpm constante. La aleta recubierta con el microorganismo a diferentes concentraciones se extrajo del mezclador y se colocó en una placa de agar R2A después de la dilución en serie.

Se encontró que la concentración de los microorganismos que recubren la aleta variaban dependiendo de los valores de D.O. Cuando la D.O. fue de 0,749, el grado de recubrimiento fue de aproximadamente $1,53 \times 10^8 \pm 1,52 \times 10^7$ UFC/g de la aleta. Y, cuando la D.O. fue de 0,588 y 0,55, el grado de recubrimiento fue de aproximadamente $4,00 \times 10^7 \pm 1,00 \times 10^7$ UFC/g de la aleta y $1,03 \times 10^7 \pm 8,50 \times 10^5$ UFC/g de la aleta, respectivamente. Además, cuando la D.O. fue de 0,5 y 0,45, el grado de recubrimiento fue de $6,00 \times 10^6 \pm 7,00 \times 10^5$ UFC/g de la aleta y $2,53 \times 10^6 \pm 3,51 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente. Es decir, el grado de recubrimiento era proporcional a la D.O. El valor de D.O. de 0,5 a la que recubrieron los microorganismos a una concentración de 10^6 UFC/g, que es similar al nivel del núcleo de un evaporador a partir del cual se aislaron los microorganismos, se seleccionó para el recubrimiento con las otras 10 especies de microorganismos inodoras.

(2) Evaluación de la capacidad de recubrimiento de los microorganismos inodoros sobre núcleo de un evaporador y la aleta

Como resultado de una prueba de recubrimiento de la aleta, las 11 especies de microorganismos inodoros mostraron el mismo grado de recubrimiento a la misma D.O. independientemente del género. Por consiguiente, se midió la cantidad de *Methylobacterium aquaticum* que recubría un núcleo de un evaporador usando un cultivo correspondiente al valor de D.O. de la aleta.

El *Methylobacterium aquaticum* ajustado a D.O. 0,5 mostró un grado de recubrimiento de $8,95 \times 10^6 \pm 5,51 \times 10^5$ UFC/g de aleta sobre el núcleo de un evaporador. Cuando el mismo cultivo recubrió el núcleo de un evaporador, el grado de recubrimiento fue de $2,55 \times 10^6 \pm 3,51 \times 10^5$ UFC/g de aleta. Por consiguiente, se confirmó que los microorganismos recubrían con el mismo grado cuando se utiliza el cultivo de la misma D.O.

Ejemplo 10: Evaluación sensorial de los microorganismos aislados que recubren en núcleo de un evaporador

(1) Recubrimiento de 11 especies de microorganismos inodoros sobre el recubrimiento del núcleo de un evaporador y la evaluación sensorial

Para la evaluación sensorial de los microorganismos identificados en el Ejemplo 8, cada una de las 11 especies de microorganismos inodoras recubrió un núcleo de un evaporador.

Los olores desagradables generados por los microorganismos se analizaron a través de una prueba de evaluación olfativa. Los núcleos de evaporador recubiertos de microorganismos fueron evaluados por 15 paneles de evaluación sensorial. Como resultado, las 11 especies de microorganismos marcaron $1,78 \pm 0,41$ (escala de 5 puntos, 0: sin olor; 1: olor muy débil (olor apenas detectable); 2: olor débil (olor difícil de distinguir); 3: olor distinto (olor distinguible); 4: olor fuerte; 5: olor muy fuerte). La especie *Methylobacterium* mostró una puntuación inferior a la media de $1,625 \pm 0,29$. Las 3 cepas comunes, *Methylobacterium aquaticum*, *Methylobacterium brachiatum* y *Methylobacterium platani*, se calificaron como $1,6 \pm 0,35$. *Deinococcus fucus* obtuvo la puntuación más alta de 2,8, seguido de *Bacillus vietnamensis* de 2,1 (Tabla 8).

Basándose en el resultado de la evaluación sensorial, las 3 especies de microorganismos que generan olores relativamente fuertes, *Methylobacterium brachiatum*, *Bacillus vietnamensis* y *Deinococcus fucus*, fueron excluidos.

Evaluación sensorial de microorganismos que recubren el núcleo de un evaporador					
No.	Cepa	Olor en el aire	Olor en las condiciones de reconstitución*	Resultado de la evaluación (escala de 5 puntos)	Selección
1	<i>Methylobacterium aquaticum</i>	inodoro	inodoro	1,4	seleccionado
2	<i>Methylobacterium brachiatum</i>	inodoro	X	2	-
3	<i>Methylobacterium platani</i>	inodoro	inodoro	1,4	seleccionado
4	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	inodoro	inodoro	1,5	seleccionado
5	<i>Bacillus vietnamensis</i>	inodoro	X	2,1	-
6	<i>Brevibacillus invocatus</i>	inodoro	inodoro	1,5	seleccionado
7	<i>Deinococcus ficus</i>	inodoro	X	2,8	-
8	<i>Leifsonia soli</i>	inodoro	inodoro	1,7	seleccionado
9	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	inodoro	inodoro	1,6	seleccionado
10	<i>Sphingomonas aquatilis</i>	inodoro	inodoro	1,6	seleccionado
11	<i>Methylobacterium komagatae</i>	inodoro	inodoro	1,7	seleccionado
Ref.	Control (núcleo de un evaporador esterilizado)	-	-	2,1	

Condiciones de reconstitución*: Etapa 1: Después de suministrar gasolina (fuente nutricional para microorganismos), se hizo funcionar un aparato de reconstitución durante 2 horas (temperatura: 25°C, humedad: 50-90%, velocidad del aire: 170 CMH, fuente nutricional: 10 ppm de gasolina).

Etapa 2: Después de detener el funcionamiento del aparato de reconstitución (temperatura: 25°C, humedad: 30-50%, velocidad del aire: 0 CMH), se evaluó el olor después de abrir ligeramente la entrada del aparato de reconstitución.

(2) Evaluación sensorial de combinaciones de microorganismos inodoros

Las 8 especies de microorganismos inodoros seleccionados en base a la evaluación sensorial se combinaron con *Methylobacterium aquaticum* y *Methylobacterium platani* para obtener 14 combinaciones optimizadas de microorganismos inodoros. Para la evaluación sensorial de las combinaciones de microorganismos inodoros, se mezclaron con la misma densidad y recubrieron un núcleo de evaporador.

Como resultado de la evaluación olfativa, la puntuación media de evaluación sensorial de las 14 combinaciones fue de $1,89 \pm 0,52$ (escala de 5 puntos). La combinación 14 que contenía las cepas comunes, así como *Acinetobacter johnsonii*, *Sphingomonas aquatilis* y *Pseudomonas nitroreducens*, mostró la puntuación más baja de la evaluación sensorial de 1,25 y la combinación que contenía las cepas comunes y *Acinetobacter johnsonii* mostró la puntuación más alta de evaluación sensorial de 3,14 (tabla 10). Basándose en esta evaluación cuantitativa y una prueba de evaluación de la calidad del olor, las 10 combinaciones, con exclusión de las 2 combinaciones que contienen las cepas comunes y una de *Acinetobacter johnsonii* y *Brevibacillus invocatus*, la combinación 7 que contiene *Brevibacillus invocatus*, *Sphingomonas aquatilis* y *Methylobacterium komagatae*, y la combinación 13 que contiene *Leifsonia soli*, *Sphingomonas aquatilis* y *Pseudomonas nitroreducens*, fueron seleccionadas para una prueba de supervivencia final.

Tabla 10

Evaluación sensorial de combinaciones de microorganismos inodoros			
No.	Combinación	Evaluación olfativa	Resultado
1	Cepas comunes (<i>Methylobacterium aquaticum</i> y <i>Methylobacterium platani</i>)	1,98	seleccionado
2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	3,14	X
3	<i>Brevibacillus invocatus</i>	2,12	X
4	<i>Sphingomonas aquatilis</i> y <i>Brevibacillus</i>	1,38	seleccionado

	<i>invocatus</i>		
5	<i>Leifsonia soli</i> y <i>Methylobacterium komagatae</i>	1,38	seleccionado
6	<i>Acinetobacter johnsonii</i> , <i>Sphingomonas aquatilis</i> y <i>Methylobacterium komagatae</i>	1,33	seleccionado
7	<i>Brevibacillus invocatus</i> , <i>Sphingomonas aquatilis</i> y <i>Methylobacterium komagatae</i>	2,33	X
8	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	2,13	seleccionado
9	<i>Acinetobacter johnsonii</i> y <i>Pseudomonas nitroreducens</i>	2	seleccionado
10	<i>Brevibacillus invocatus</i> , <i>Acinetobacter johnsonii</i> y <i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1,5	seleccionado
11	<i>Leifsonia soli</i> y <i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1,86	seleccionado
12	<i>Brevibacillus invocatus</i> , <i>Sphingomonas aquatilis</i> y <i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1,7	seleccionado
13	<i>Leifsonia soli</i> , <i>Sphingomonas aquatilis</i> y <i>Pseudomonas nitroreducens</i>	2,38	X
14	<i>Acinetobacter johnsonii</i> , <i>Sphingomonas aquatilis</i> y <i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1,25	seleccionado

Ejemplo 11: Evaluación de la supervivencia de 10 combinaciones durante 30 días

5 Para las combinaciones de microorganismos seleccionados en base al resultado de la evaluación sensorial en el Ejemplo 9- (2), se llevó a cabo la evaluación de supervivencia durante 30 días. El número y los microorganismos de las combinaciones son los siguientes (Tabla 11).

Tabla 11

Combinaciones de microorganismos utilizados en la evaluación de supervivencia durante 30 días	
No.	Combinación
1	<i>Methylobacterium aquaticum</i> , <i>Methylobacterium platani</i> , <i>Brevibacillus invocatus</i> , <i>Sphingomonas aquatilis</i> y <i>Pseudomonas nitroreducens</i>
2	<i>Methylobacterium aquaticum</i> , <i>Methylobacterium platani</i> , <i>Acinetobacter johnsonii</i> , <i>Sphingomonas aquatilis</i> y <i>Pseudomonas nitroreducens</i>
3	<i>Methylobacterium aquaticum</i> , <i>Methylobacterium platani</i> , <i>Acinetobacter johnsonii</i> , <i>Sphingomonas aquatilis</i> y <i>Methylobacterium komagatae</i>
4	<i>Methylobacterium aquaticum</i> , <i>Methylobacterium platani</i> , <i>Brevibacillus invocatus</i> , <i>Acinetobacter johnsonii</i> y <i>Pseudomonas nitroreducens</i>
5	<i>Methylobacterium aquaticum</i> , <i>Methylobacterium platani</i> , <i>Acinetobacter johnsonii</i> y <i>Pseudomonas nitroreducens</i>
6	<i>Methylobacterium aquaticum</i> , <i>Methylobacterium platani</i> , <i>Leifsonia soli</i> y <i>Pseudomonas nitroreducens</i>
7	<i>Methylobacterium aquaticum</i> , <i>Methylobacterium platani</i> , <i>Leifsonia soli</i> y <i>Methylobacterium komagatae</i>
8	<i>Methylobacterium aquaticum</i> , <i>Methylobacterium platani</i> , <i>Sphingomonas aquatilis</i> y <i>Brevibacillus invocatus</i>
9	<i>Methylobacterium aquaticum</i> , <i>Methylobacterium platani</i> y <i>Pseudomonas nitroreducens</i>
10	<i>Methylobacterium aquaticum</i> y <i>Methylobacterium platani</i>

10 Los microorganismos se cultivaron y recubrieron un núcleo de un evaporador en orden de la combinación 1 a la combinación 10. El grado de recubrimiento fue de 10^6 UFC/g de aleta.

15 La combinación 1 mostró un grado de recubrimiento de $1,09 \times 10^7 \pm 8,65 \times 10^5$ UFC/g de aleta sobre el núcleo de un evaporador. Se detectó una colonia de color rojo a $8,70 \times 10^6 \pm 2,35 \times 10^6$ UFC/g de la aleta, una colonia blanca a $2,50 \times 10^5 \pm 7,07 \times 10^4$ UFC/g de la aleta y una colonia de color amarillo a $1,90 \times 10^6 \pm 1,73 \times 10^5$ UFC/g de la aleta. 30 días más tarde, el recuento total de bacterias fue de $4,63 \times 10^6 \pm 5,09 \times 10^4$ UFC/g de la aleta, siendo el de la colonia roja de sólo $4,63 \times 10^6 \pm 1,53 \times 10^5$ UFC/g de aleta (Figura 2). Es decir, la proporción de la colonia de color rojo, que representaba más del 80%, aumentó a 100% 30 días más tarde (Figura 3). Basado en el fenotipo, se sospechó que la colonia roja contenía *Methylobacterium* que contiene un pigmento de color rosa. Tras el análisis mediante REP-PCR, no se detectaron a tiempo cero *Methylobacterium platani* ni *Brevibacillus invocatus*. En particular, cabe indicar que no se detectó el *Methylobacterium platani* que se utilizó como una cepa común. Para la combinación 1, se detectó *Methylobacterium aquaticum*, la mayor cantidad en 70 de un total de 86 muestras de REP-PCR en tiempo 0. *Sphingomonas aquatilis* se detectó en 12 muestras y *Pseudomonas nitroreducens* se detectó en 4

muestras. Después de 30 días, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en las 32 muestras, mientras que los otros microorganismos no se detectaron (Figura 4).

5 En la combinación 2, se utilizaron *Acinetobacter johnsonii*, *Sphingomonas aquatilis* y *Pseudomonas nitroreducens* junto con las cepas comunes *Methylobacterium aquaticum* y *Methylobacterium platani*. A tiempo 0, el recuento total de bacterias en el núcleo de un evaporador fue de $1,52 \times 10^7 \pm 5,42 \times 10^5$ UFC/g de aleta. 30 días más tarde, el recuento total de bacterias en el núcleo de un evaporador fue de $3,23 \times 10^6 \pm 8,39 \times 10^4$ UFC/g de aleta. El análisis del patrón de REP-PCR reveló que *Methylobacterium aquaticum*, *Sphingomonas aquatilis* y *Pseudomonas nitroreducens* sobrevivían en el núcleo de un evaporador a tiempo 0. De las 105 muestras de REP-PCR, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en 94 muestras, se detectó *Sphingomonas aquatilis* en 7 muestras y se detectó *Pseudomonas nitroreducens* en 4 muestras. Después de 30 días, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en las 30 muestras de REP-PCR (Figura 5).

15 Para la combinación 3, el recuento total de bacterias fue de $1,83 \times 10^7 \pm 3,89 \times 10^5$ UFC/g de aleta a tiempo 0. 30 días más tarde, el recuento total de bacterias fue de $5,23 \times 10^6 \pm 1,50 \times 10^5$ UFC/g de aleta. Cuando se analizó la población de microorganismos mediante REP-PCR, entre los 5 microorganismos contenidos en la combinación, 4 microorganismos *Methylobacterium aquaticum*, *Acinetobacter johnsonii*, *Sphingomonas aquatilis* y *Methylobacterium komagatae*, excluyendo *Methylobacterium platani*, sobrevivían en el núcleo de un evaporador a tiempo 0. Después de 30 días, *Methylobacterium komagatae*, así como *Methylobacterium aquaticum*, una de las cepas comunes, sobrevivían. A tiempo 0, de 101 muestras, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en 49 muestras, se detectó *Acinetobacter johnsonii* en 1 muestra, se detectó *Sphingomonas aquatilis* en 11 muestras y se detectó *Methylobacterium komagatae* en 40 muestras. Después de 30 días, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en 19 muestras y se detectó *Methylobacterium komagatae* en 15 muestras (Figura 6). Se encontró que la relación de las dos especies de *Methylobacterium* supervivientes fue constante a aproximadamente 1:1 durante 30 días (Figura 7).

25 Para la combinación 4, el recuento total de bacterias de las 5 cepas fue de $2,04 \times 10^7 \pm 4,91 \times 10^5$ UFC/g de la aleta en el momento de recubrimiento. Cuando se analizó la población de microorganismos mediante REP-PCR, de 86 muestras, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en 80 muestras, se detectó *Methylobacterium platani* en 1 muestra, se detectó *Brevibacillus invocatus* en 3 muestras y se detectó *Pseudomonas nitroreducens* en 2 muestras (Figura 8).

35 La combinación 5 consistía en 4 cepas *Methylobacterium aquaticum*, *Methylobacterium platani*, *Acinetobacter johnsonii* y *Pseudomonas nitroreducens*. En el momento del recubrimiento sobre un núcleo de un evaporador, el recuento total de bacterias fue de $2,86 \times 10^7 \pm 1,19 \times 10^6$ UFC/g de aleta. Cuando la población de microorganismos se analizó mediante REP-PCR, de 28 muestras, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en 24 muestras, y no se detectaron *Acinetobacter johnsonii* y *Pseudomonas nitroreducens* en 2 muestras, respectivamente (Figura 9).

40 A partir de la evaluación de supervivencia de las combinaciones de microorganismos, se encontró que el *Methylobacterium platani* utilizado como la cepa común muestra una baja de capacidad de supervivencia cuando recubre el núcleo de un evaporador con otros microorganismos. Por lo tanto, se prepararon combinaciones adicionales de microorganismos usando la otra cepa común *Methylobacterium aquaticum* y la *Methylobacterium komagatae*, que mostraron una supervivencia comparable durante 30 días, y se evaluó la supervivencia durante 30 días.

45 **Ejemplo 12: Evaluación de la supervivencia de 6 combinaciones adicionales durante 30 días**

50 Se seleccionó *Methylobacterium komagatae* como microorganismo para sustituir *Methylobacterium platani*, que mostró una pobre capacidad de supervivencia en la evaluación de supervivencia durante 30 días. *Methylobacterium komagatae* se combinó con la cepa común *Methylobacterium aquaticum* para preparar 6 combinaciones adicionales de microorganismos (Tabla 12). Las combinaciones preparadas adicionalmente contenían un pequeño número de microorganismos que exhibían una excelente capacidad de supervivencia, aunque no eran inodoros, con el fin de preparar combinaciones más estables.

Tabla 12

55

Combinaciones adicionales de microorganismos utilizados en la evaluación de la supervivencia durante 30 días	
	Combinación
A	<i>Methylobacterium aquaticum</i> , <i>Methylobacterium komagatae</i> , <i>Bacillus vietnamensis</i> y <i>aquaticum Deinococcus ficus</i>
B	<i>Methylobacterium aquaticum</i> , <i>Methylobacterium komagatae</i> , <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> , <i>Deinococcus apachensis</i> y <i>Bacillus subtilis</i> . Subespecie <i>Subtilis</i>
C	<i>Methylobacterium aquaticum</i> , <i>Methylobacterium komagatae</i> , <i>Spirosoma linguale</i> , <i>Sphingomonas dokdonensis</i> y <i>Leifsonia soli</i>
D	<i>Methylobacterium aquaticum</i> , <i>Methylobacterium komagatae</i> , <i>Microbacterium flavescens</i> , <i>Leifsonia shinshuensis</i> y <i>Methylobacterium aerolatam</i>

E	<i>Methylobacterium aquaticum</i> , <i>Methylobacterium komagatae</i> , <i>Spirosoma panaciterrae</i> , <i>Flavobacterium oceanosedimentum</i> y <i>Brevundimonas kwangchunensis</i>
F	<i>Methylobacterium aquaticum</i> , <i>Methylobacterium komagatae</i> , <i>Methylobacterium brachiatum</i> , <i>Paenibacillus timonensis</i> y <i>Rhizobium massiliae</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>

Para la combinación A, el recuento total de bacterias en el núcleo de un evaporador fue de $4,30 \times 10^6 \pm 1,25 \times 10^6$ UFC/g de la aleta en el momento del recubrimiento. Incluso después de 30 días, los microorganismos sobrevivían a $4,30 \times 10^6 \pm 1,25 \times 10^6$ UFC/g de aleta. Cuando se investigó la población de microorganismos recubiertos mediante análisis de patrones por REP-PCR, de 45 muestras, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en 8 muestras y se detectó *Methylobacterium komagatae* en 37 muestras. Después de 30 días, de las 20 muestras, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en 5 muestras, se detectó *Methylobacterium komagatae* en 15 muestras. Aunque la relación de *Methylobacterium aquaticum* aumentó ligeramente, el cambio no fue significativo (Fig. 10).

Para la combinación B, el recuento total de bacterias fue de $2,07 \times 10^7 \pm 1,11 \times 10^6$ UFC/g de aleta a tiempo 0. Después de 30 días, el recuento total de bacterias fue de $1,74 \times 10^7 \pm 1,30 \times 10^6$ UFC/g de aleta. Cuando se investigó la población de los microorganismos mediante REP-PCR, de 34 muestras representativas, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en 1 muestra y se detectó *Methylobacterium komagatae* en 11 muestras. Las otras 22 muestras resultaron ser *Deinococcus apachensis*. Es decir, 40% o más de los microorganismos recubiertos fueron *Deinococcus apachensis* (Figura 11). Después de 30 días, el análisis del patrón por REP-PCR reveló que los microorganismos supervivientes fueron *Methylobacterium aquaticum* 11,1%, *Methylobacterium komagatae* 22,2% y *Deinococcus apachensis* 66,6%. Es decir, aunque la proporción de *Methylobacterium aquaticum* aumentó ligeramente en comparación con el tiempo 0, los 3 microorganismos sobrevivían.

Para la combinación C, se utilizaron *Methylobacterium aquaticum*, *Methylobacterium komagatae*, *Spirosoma linguale*, *Sphingomonas dokdonensis* y *Leifsonia soli*. Cuando la combinación de las 5 cepas recubrió un núcleo de un evaporador, el recuento total de bacterias fue de $7,53 \times 10^6 \pm 3,74 \times 10^5$ UFC/g de aleta. Después de 30 días, el recuento total de bacterias fue de $3,70 \times 10^6 \pm 137 \times 10^5$ UFC/g de aleta.

Como resultado de análisis de patrón por REP-PCR para la identificación de los microorganismos supervivientes, de 51 muestras representativas, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en 4 muestras, se detectó *Methylobacterium komagatae* en 30 muestras, se detectó *Spirosoma linguale* en 3 muestras y se detectó *Sphingomonas dokdonensis* en 14 muestras a tiempo 0. Después de 30 días, *Methylobacterium aquaticum* fue del 29,6% y *Methylobacterium komagatae* fue del 59,2%. Es decir, la proporción de *Methylobacterium aquaticum* aumentó ligeramente. *Spirosoma linguale* no se detectó y la relación de *Sphingomonas dokdonensis* disminuyó ligeramente hasta 11,1% en comparación con a tiempo 0 (Figura 12).

Para la combinación D, el recuento total de bacterias a tiempo 0 fue de $1,75 \times 10^7 \pm 1,24 \times 10^6$ UFC/g de aleta. Después de 30 días, el recuento total de bacterias fue de $6,03 \times 10^6 \pm 1,01 \times 10^6$ UFC/g de aleta. Cuando se investigó la relación de las bacterias mediante REP-PCR, *Methylobacterium aquaticum* fue del 16,3%, *Methylobacterium komagatae* fue del 47,3% y *Microbacterium flavescens* fue del 36,4% a tiempo 0. Después de 30 días, *Methylobacterium aquaticum* aumentó a 34,3% y *Methylobacterium komagatae* también aumentó ligeramente a 57,1%. En cambio, *Microbacterium flavescens* disminuyó a 8,6% (Figura 13).

Para la combinación E, el recuento total de bacterias fue de $8,53 \times 10^6 \pm 3,21 \times 10^5$ UFC/g de aleta a tiempo 0. Después de 30 días, el recuento total de bacterias fue de $1,20 \times 10^6 \pm 3,84 \times 10^4$ UFC/g de aleta. Cuando se analizó la población mediante REP-PCR, de 75 muestras, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en 8 muestras, se detectó *Methylobacterium komagatae* en 21 muestras, se detectó *Flavobacterium oceanosedimentum* en 32 muestras y se detectó *Brevundimonas kwangchunensis* en 14 muestras a tiempo 0. Después 30 días, de 89 muestras representativas, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en 16 muestras, se detectó *Methylobacterium komagatae* en 32 muestras, se detectó *Flavobacterium oceanosedimentum* en 39 muestras y se detectó *Brevundimonas kwangchunensis* en 2 muestras, respectivamente (Figura 14).

El *Spirosoma panaciterrae* fue apenas detectable a tiempo 0 y la relación de *Brevundimonas kwangchunensis* se redujo significativamente después de 30 días.

Para la combinación F, se utilizaron 6 cepas que incluyen las dos cepas comunes de la especie *Methylobacterium*. A tiempo 0, el recuento total de bacterias fue de $1,60 \times 10^7 \pm 1,15 \times 10^6$ UFC/g de aleta. Después de 30 días, el recuento total de bacterias fue de $9,03 \times 10^6 \pm 2,42 \times 10^5$ UFC/g de aleta. Cuando la población de las cepas se analizó mediante REP-PCR, de 71 muestras representativas, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en 54 muestras y se detectó *Methylobacterium komagatae* en 17 muestras a tiempo 0. Después de 30 días, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en 50 muestras y se detectó *Methylobacterium komagatae* en 23 muestras de 73 muestras (Figura 15).

Ejemplo 13: Evaluación de la supervivencia de combinaciones de cepas comunes durante 90 días

Para la evaluación del efecto a largo plazo durante 90 días, se prepararon varias combinaciones de microorganismos inodoros. En primer lugar, se probaron durante 90 días *Methylobacterium aquaticum* y *Methylobacterium komagatae*, como cepas comunes incluídas en todas las combinaciones.

5 Cuando las dos cepas de la especie *Methylobacterium* recubrieron un núcleo de un evaporador, se midió que el recuento total de bacterias fue de $1,92 \times 10^7 \pm 8,02 \times 10^5$ UFC/g de aleta a tiempo 0. Se tomaron 5 g de la aleta cada 30 días y se midió el recuento total de bacterias. El número de bacterias supervivientes fue de $8,70 \times 10^6 \pm 6,56 \times 10^5$ UFC/g de la aleta después de 30 días, $4,10 \times 10^6 \pm 3,00 \times 10^5$ UFC/g de la aleta después de 60 días y $3,13 \times 10^6 \pm 5,51 \times 10^5$ UFC/g de la aleta después de 90 días (Figura 16). Se sometieron 71, 66, 41 y 44 muestras representativas tomadas de cada lugar de muestreo a análisis de patrones mediante REP-PCR. A tiempo 0, se detectó *Methylobacterium aquaticum* en 37 muestras y se detectó *Methylobacterium komagatae* en 34 muestras. Después de 30, 60 y 90 días, los números de las muestras fueron 35 y 31, 27 y 14, y 25 y 19, respectivamente (Figura 17). Es decir, el % de relación de *Methylobacterium aquaticum* fue de 52,1-65,8% y el de *Methylobacterium komagatae* fue de 34,1-47,9%. Esta relación uniforme sugiere que las dos cepas pueden coexistir durante un periodo a largo plazo.

Ejemplo 14: Evaluación de la supervivencia de combinaciones de cepas comunes sobre un soporte para vehículo

20 Con el fin de investigar el crecimiento de una combinación de las cepas comunes *Methylobacterium aquaticum* y *Methylobacterium komagatae* bajo condiciones al aire libre, las dos cepas recubrieron un núcleo de un evaporador y el núcleo de un evaporador se montó sobre un soporte, que a su vez se instaló en un techo de vehículo. Después de la operación, se investigó el cambio en las cepas expuestas al aire exterior.

25 En el núcleo de un evaporador recubierto con las dos cepas, el recuento total de bacterias fue de $3,20 \times 10^7 \pm 6,56 \times 10^6$ UFC/g de aleta. El recuento total de bacterias en el núcleo de un evaporador fue de $6,23 \times 10^6 \pm 1,99 \times 10^5$ UFC/g de la aleta después de 30 días y $1,08 \times 10^6 \pm 4,36 \times 10^4$ UFC/g de la aleta después de 60 días (Figura 18). A pesar de que el núcleo de un evaporador se expuso al medio exterior, no se detectaron microorganismos exógenos distintos de la colonia de especie *Methylobacterium* después de 60 días. Cuando se identificaron los microorganismos detectados mediante REP-PCR, la relación de las cepas fue de 1:1 a tiempo 0. Después de 30 días, *Methylobacterium aquaticum* se disminuyó a 4,2% y, después de 60 días, sólo se detectó *Methylobacterium komagatae* (figura 19).

Conclusión

35 Las 11 especies de microorganismos inodoros aislados del núcleo de un evaporador se dividieron en 4 grupos en función de las características morfológicas. Las 11 especies de microorganismos se identificaron como especies diferentes a través de la secuenciación del 16S ADNr.

40 Los microorganismos identificados mediante secuenciación de 16S rDNA se sometieron a REP-PCR y se encontró que eran 11 grupos de REP-PCR diferentes.

45 Después de realizar la evaluación sensorial de las cepas individuales después del recubrimiento sobre un núcleo de un evaporador, se seleccionaron finalmente 8 microorganismos que generaron olores relativamente menos desagradables, *Methylobacterium aquaticum*, *Methylobacterium platani*, *Acinetobacter johnsonii*, *Brevibacillus invocatus*, *Leifsonia soli*, *Pseudomonas nitroreducens*, *Sphingomonas aquatilis* y *Methylobacterium komagatae*.

50 La evaluación sensorial se llevó a cabo para 14 combinaciones preparadas a partir de las 8 especies de microorganismos seleccionados. Como resultado, se seleccionaron un total de 10 combinaciones para la prueba de supervivencia final. Entre ellas, 4 combinaciones consistieron en 5 cepas, 4 combinaciones consistieron en 4 cepas, 1 combinación consistió en 3 combinaciones y 1 combinación consistió en 2 cepas, incluyendo 2 cepas comunes. Debido a que se encontró que el *Methylobacterium platani* era inadecuado, se prepararon 6 combinaciones adicionales y se sometieron a la evaluación de supervivencia durante 30 días. Como resultado, se seleccionaron *Methylobacterium aquaticum* y *Methylobacterium komagatae* como cepas comunes. Una combinación que consiste solamente en las dos cepas comunes *Methylobacterium aquaticum* y *Methylobacterium komagatae* se sometió a la evaluación de supervivencia durante 90 días. Como resultado de la realización de la evaluación de supervivencia durante 90 días bajo condiciones de laboratorio, la combinación mantuvo una población similar a la del momento del recubrimiento. Además, se instaló un núcleo de un evaporador recubierto con la combinación de microorganismos sobre un soporte de un techo de vehículo y se evaluó la supervivencia después de la exposición a aire exterior. Como resultado, el recuento total de bacterias se mantuvo a 10^6 UFC/g de la aleta y no se detectó ningún microorganismo exógeno.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una composición para la prevención de olores de un sistema de acondicionamiento de aire, comprendiendo la composición *Methylobacterium* o un cultivo del mismo,
 5 en la que el *Methylobacterium* se selecciona de entre uno o más miembros del grupo que consiste en *Methylobacterium komagatae*, *Methylobacterium aquaticum*, *Methylobacterium brachiatum* y *Methylobacterium platani*.
2. Utilización de la composición, según la reivindicación 1,
 10 en la que el *Methylobacterium* se selecciona de entre uno o más miembros del grupo que consiste en *Methylobacterium komagatae* HKMC-11 (KCCM11335P), *Methylobacterium aquaticum* HKMC-1 (KCCM11325P), *Methylobacterium brachiatum* HKMC-2 (KCCM11326P) y *Methylobacterium platani* HKMC-3 (KCCM11327P).
3. Utilización de la composición, según la reivindicación 1, en la que la composición comprende uno o más
 15 microorganismos seleccionados del grupo que consiste en *Acinetobacter johnsonii*, *Bacillus vietnamensis*, *Brevibacillus invocatus*, *Deinococcus ficus*, *Leifsonia soli*, *Pseudomonas nitroreducens*, *Sphingomonas aquatilis*, *Deinococcus apachensis* y *Flavobacterium oceanosedimentum* o un cultivo de los mismos, o en la que la composición comprende uno o más microorganismos seleccionados del grupo que consiste en
 20 *Acinetobacter johnsonii* HKMC-4 (KCCM11328P), *Bacillus vietnamensis* HKMC-5 (KCCM11329P), *Brevibacillus invocatus* HKMC-6 (KCCM11330P), *Deinococcus ficus* HKMC-7 (KCCM11331P), *Leifsonia soli* HKMC-8 (KCCM11332P), *Pseudomonas nitroreducens* HKMC-9 (KCCM11333P), *Sphingomonas aquatilis* HKMC-10 (KCCM11334P), *Deinococcus apachensis* HKMC-12 (KCCM11499P) y *Flavobacterium oceanosedimentum* HKMC-13 (KCCM11500P) o un cultivo de los mismos.
4. Utilización de la composición para la prevención de olores, según la reivindicación 1, para el recubrimiento del
 25 núcleo de un evaporador.
5. Utilización, según la reivindicación 4, en la que los microorganismos, según la reivindicación 1, recubren el núcleo
 30 de un evaporador a una concentración de 10^4 - 10^8 UFC/g, opcionalmente en la que los microorganismos recubren utilizando un cultivo de microorganismos que tiene una densidad óptica (D.O.) de 0,3-0,9.
6. Utilización, según la reivindicación 4, en la que los microorganismos contenidos en la composición forman una
 35 biopelícula sobre el núcleo de un evaporador.
7. Procedimiento de fabricación de un núcleo de un evaporador inodoro que no genera olores de un sistema de
 acondicionamiento de aire, que comprende recubrir con la composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a
 3, el núcleo de un evaporador.
8. Procedimiento de fabricación, según la reivindicación 7, en el que dicho recubrimiento comprende recubrir con los
 40 microorganismos contenidos en la composición el núcleo de un evaporador a una concentración de 10^4 - 10^8 UFC/g.
9. Procedimiento de fabricación, según la reivindicación 7, en el que el procedimiento comprende, además, formar
 una biopelícula mediante la proliferación de los microorganismos contenidos en la composición.
- 45 10. Procedimiento para la prevención de olores de un sistema de acondicionamiento de aire, que comprende recubrir con la composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el núcleo de un evaporador.
11. Procedimiento para la prevención de olores, según la reivindicación 10, en el que dicho recubrimiento comprende
 50 recubrir con los microorganismos contenidos en la composición el núcleo de un evaporador a una concentración de 10^4 - 10^8 UFC/g.
12. Procedimiento para la prevención de olores, según la reivindicación 10, en el que el procedimiento comprende,
 55 además, formar una biopelícula mediante la proliferación de los microorganismos contenidos en la composición de recubrimiento.
13. Procedimiento para comprobar olores de un sistema de acondicionamiento de aire, que comprende recubrir con
 la composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el núcleo de un evaporador, en el que el
 60 procedimiento comprende introducir combustibles derivados del petróleo o contaminantes del aire como nutrientes para los microorganismos contenidos en la composición y comprobar si se generan olores.
14. Microorganismos para el recubrimiento del núcleo de un evaporador para evitar olores de un sistema de
 acondicionamiento de aire, según la reivindicación 10, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que
 65 consiste en *Methylobacterium komagatae* HKMC-11 (KCCM11335P), *Methylobacterium aquaticum* HKMC-1 (KCCM11325P),

- Methylobacterium brachiatum HKMC-2 (KCCM11326P),
Methylobacterium platani HKMC-3 (KCCM11327P),
Acinetobacter johnsonii HKMC-4 (KCCM11328P),
5 Bacillus vietnamensis HKMC-5 (KCCM11329P),
Brevibacillus invocatus HKMC-6 (KCCM11330P),
Deinococcus ficus HKMC-7 (KCCM11331P),
Leifsonia soli HKMC-8 (KCCM11332P),
Pseudomonas nitroreducens HKMC-9 (KCCM11333P),
Sphingomonas aquatilis HKMC-10 (KCCM11334P),
10 Deinococcus apachensis HKMC-12 (KCCM11499P) y
Flavobacterium oceanosedimentum HKMC-13 (KCCM11500P).

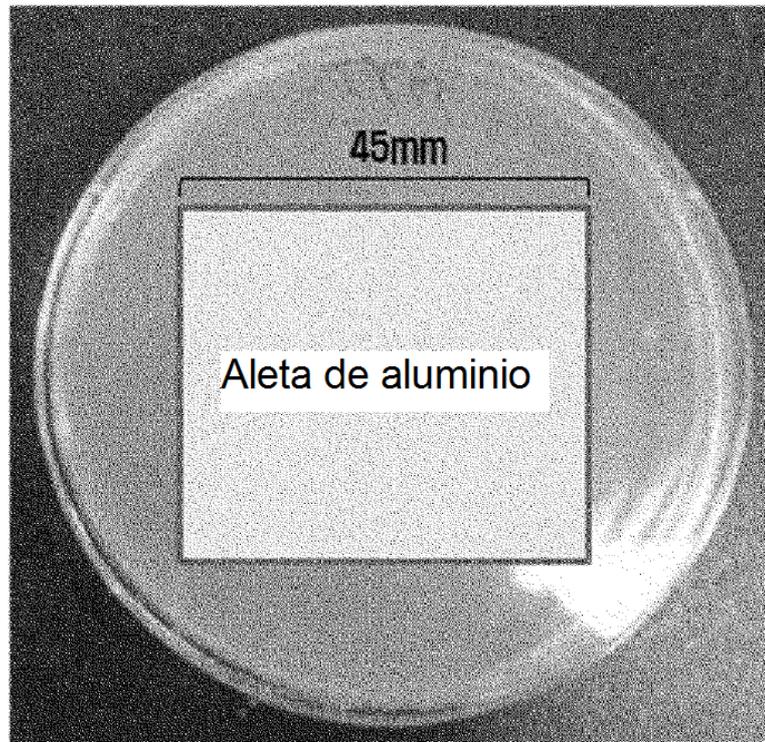


FIG. 1

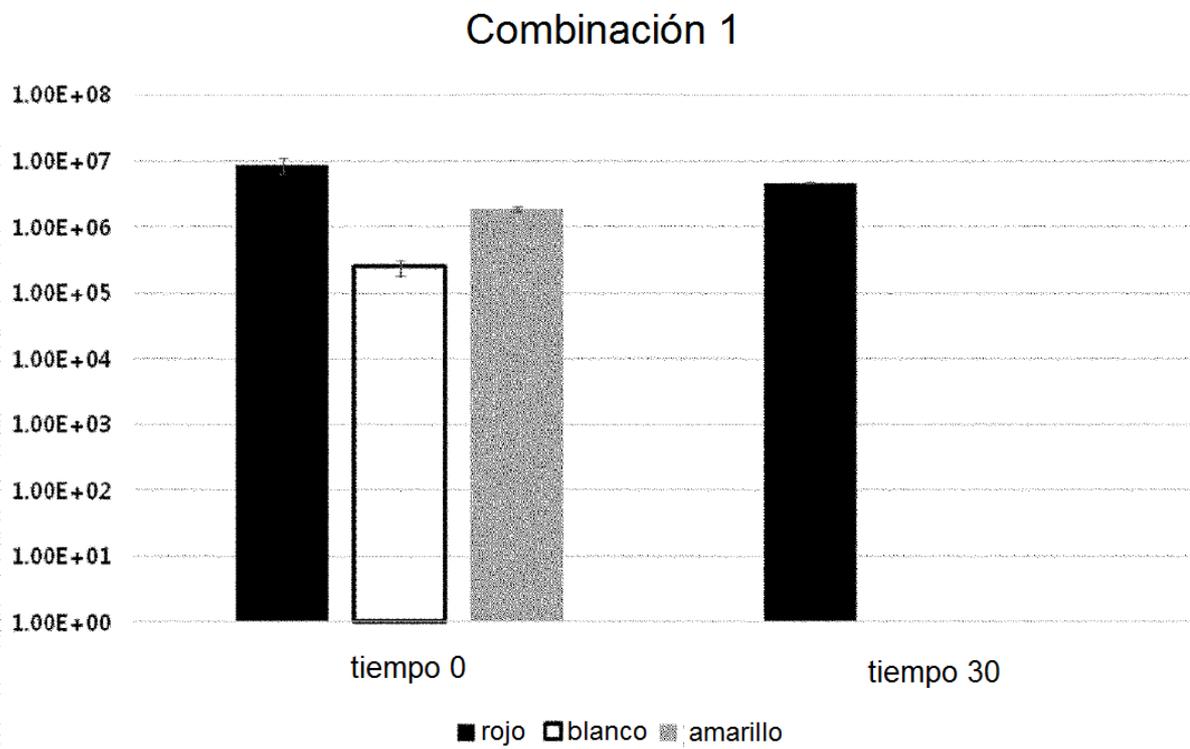


FIG. 2

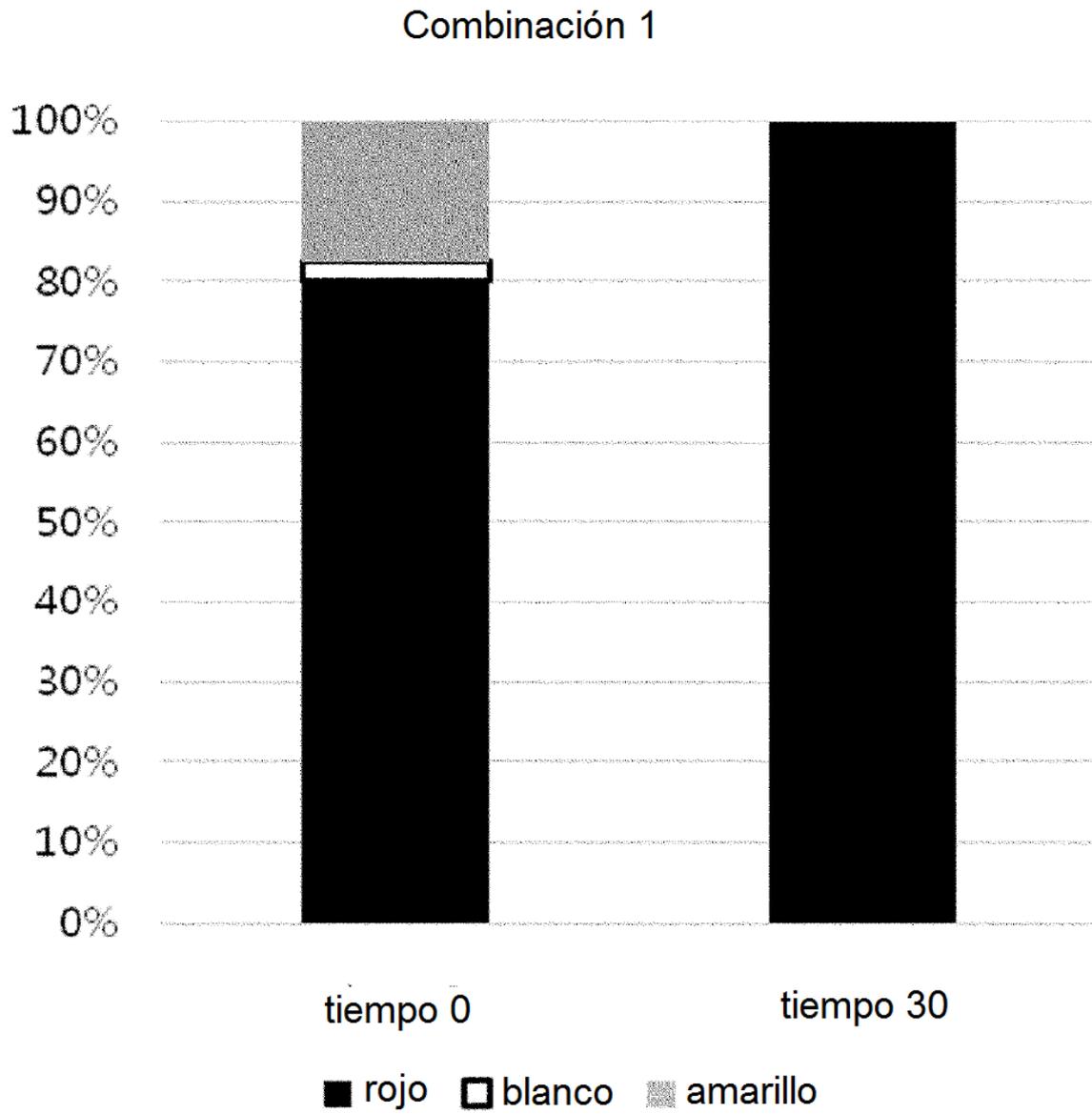


FIG. 3

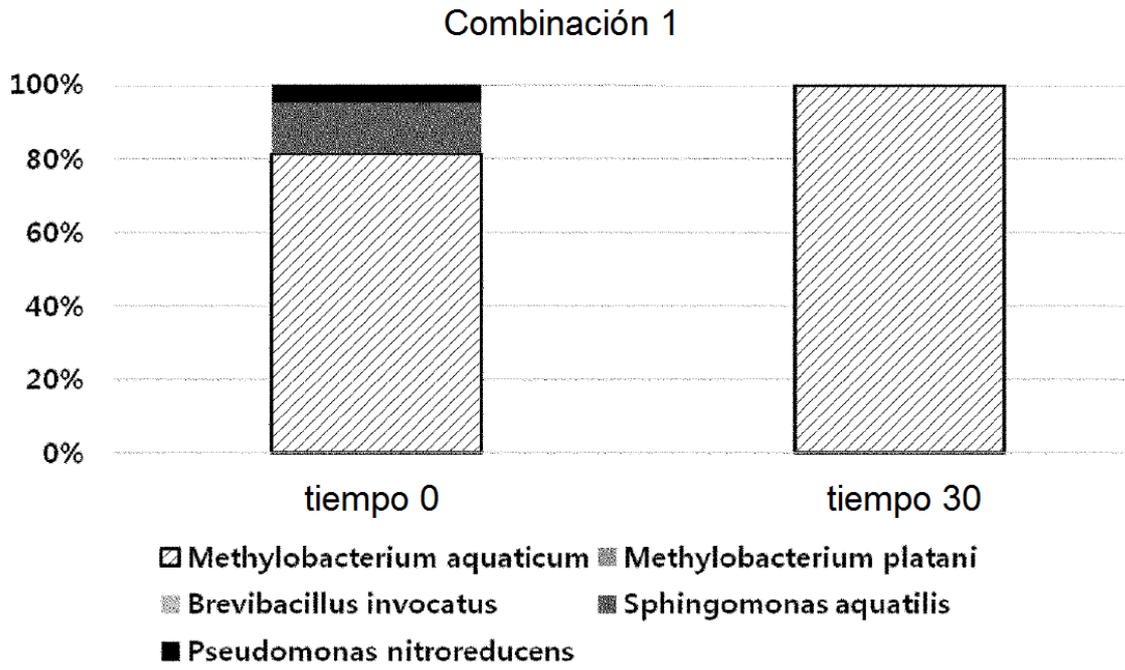


FIG. 4

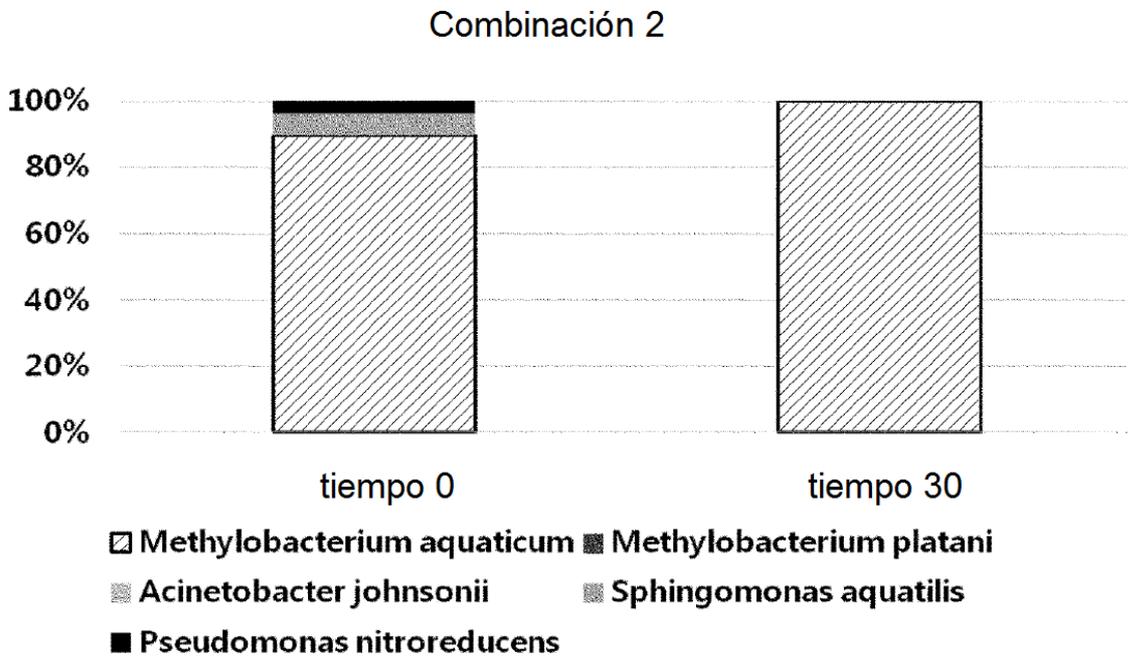
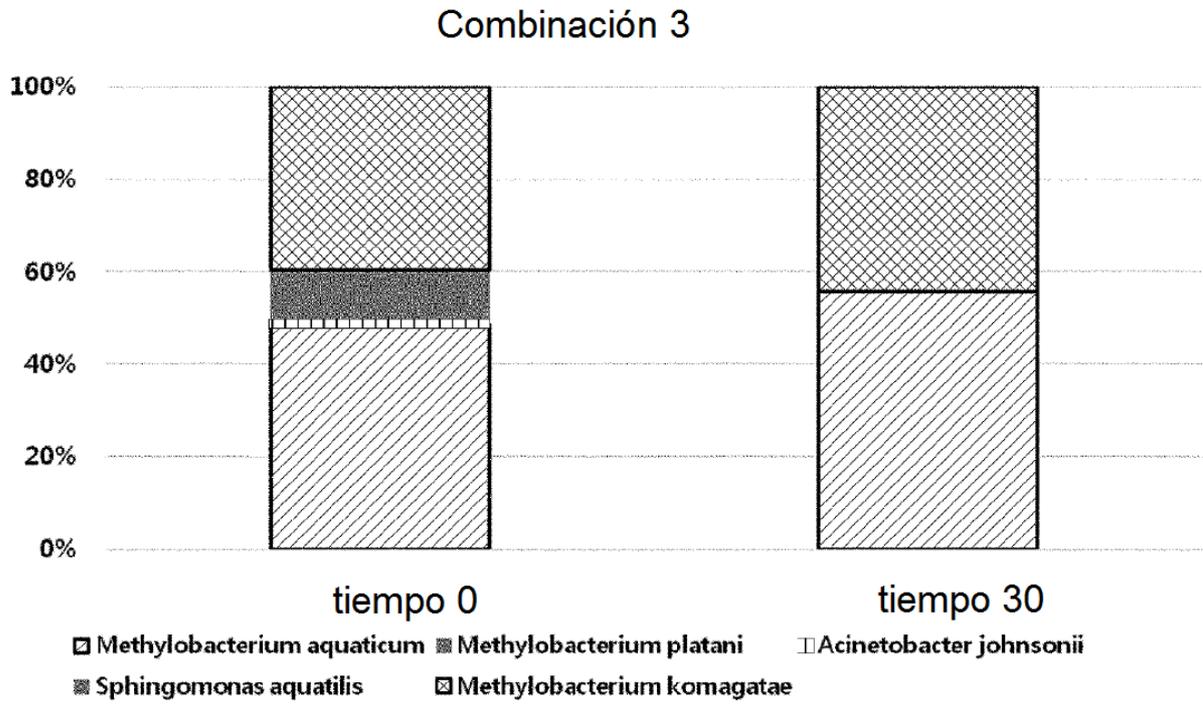


FIG. 5



Combinación 3

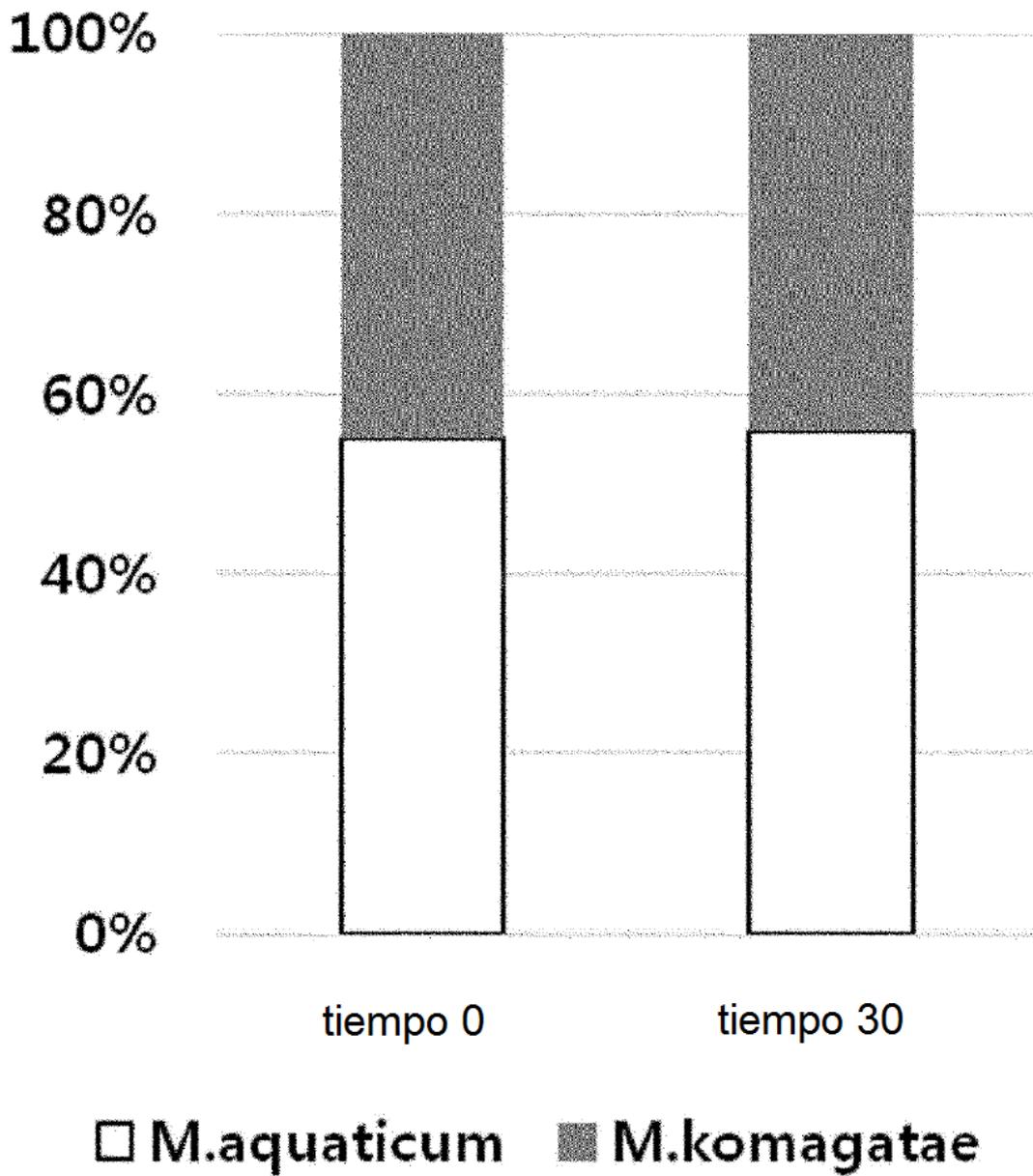


FIG. 7

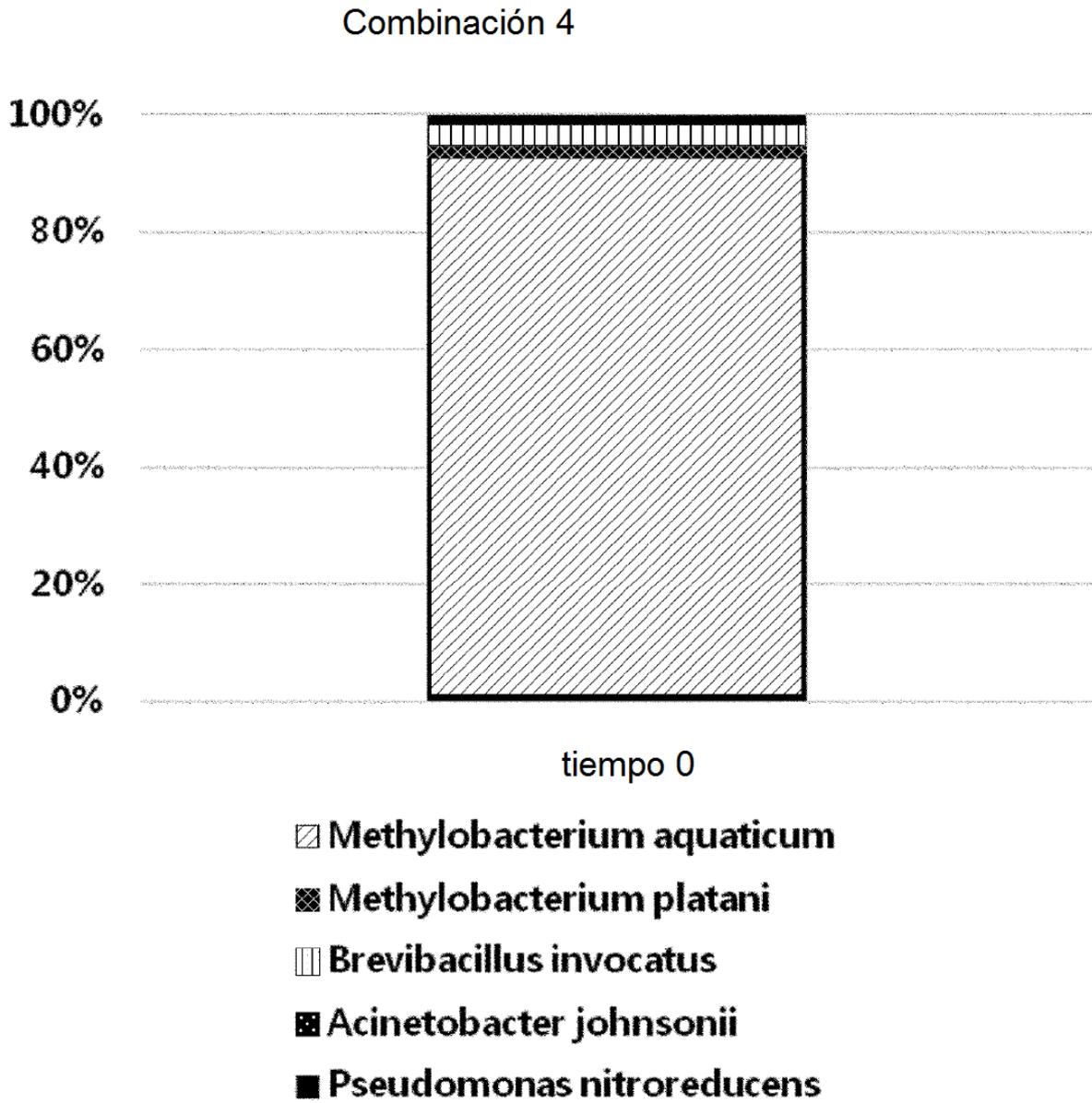


FIG. 8

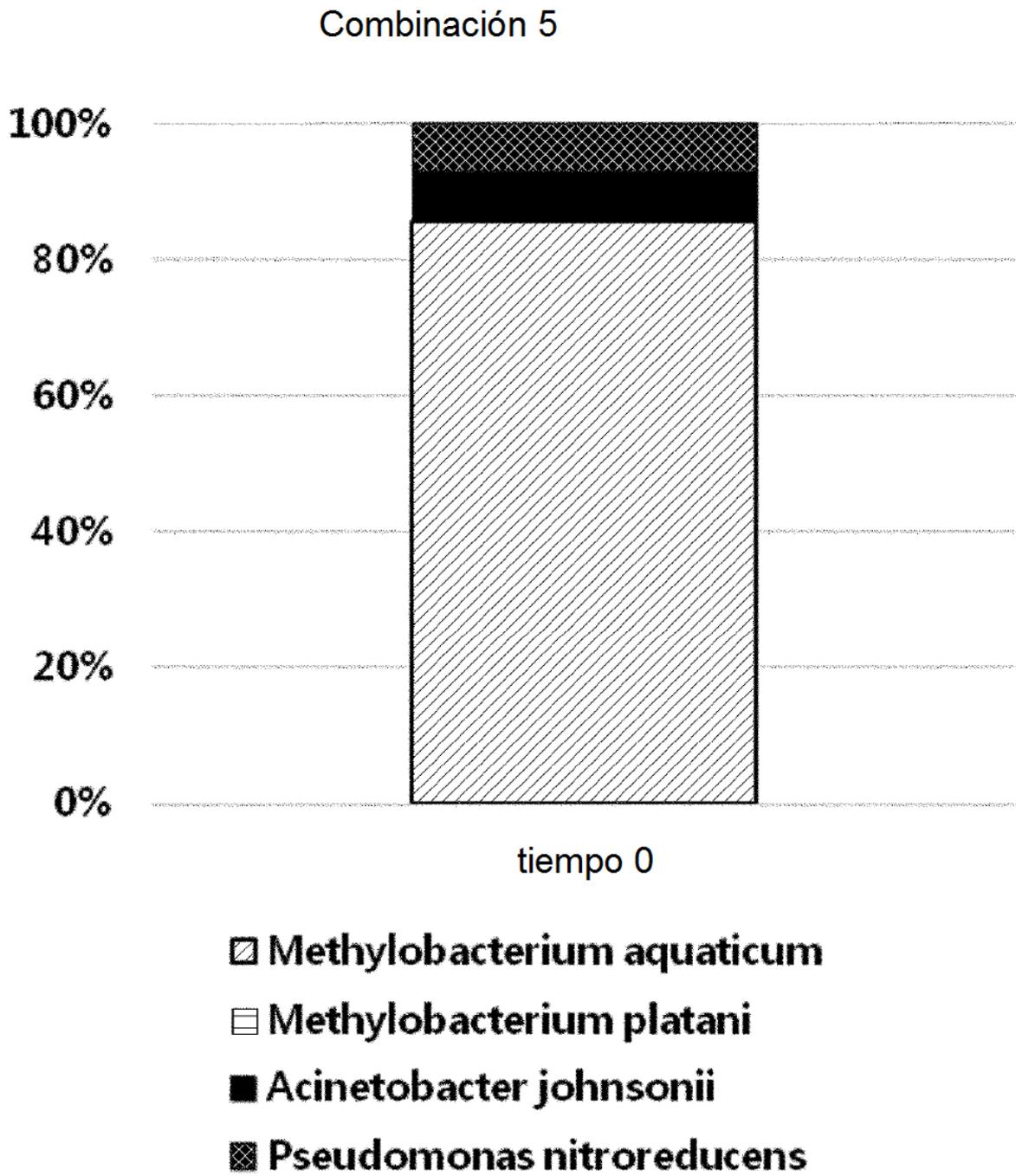


FIG. 9

REP de la combinación A

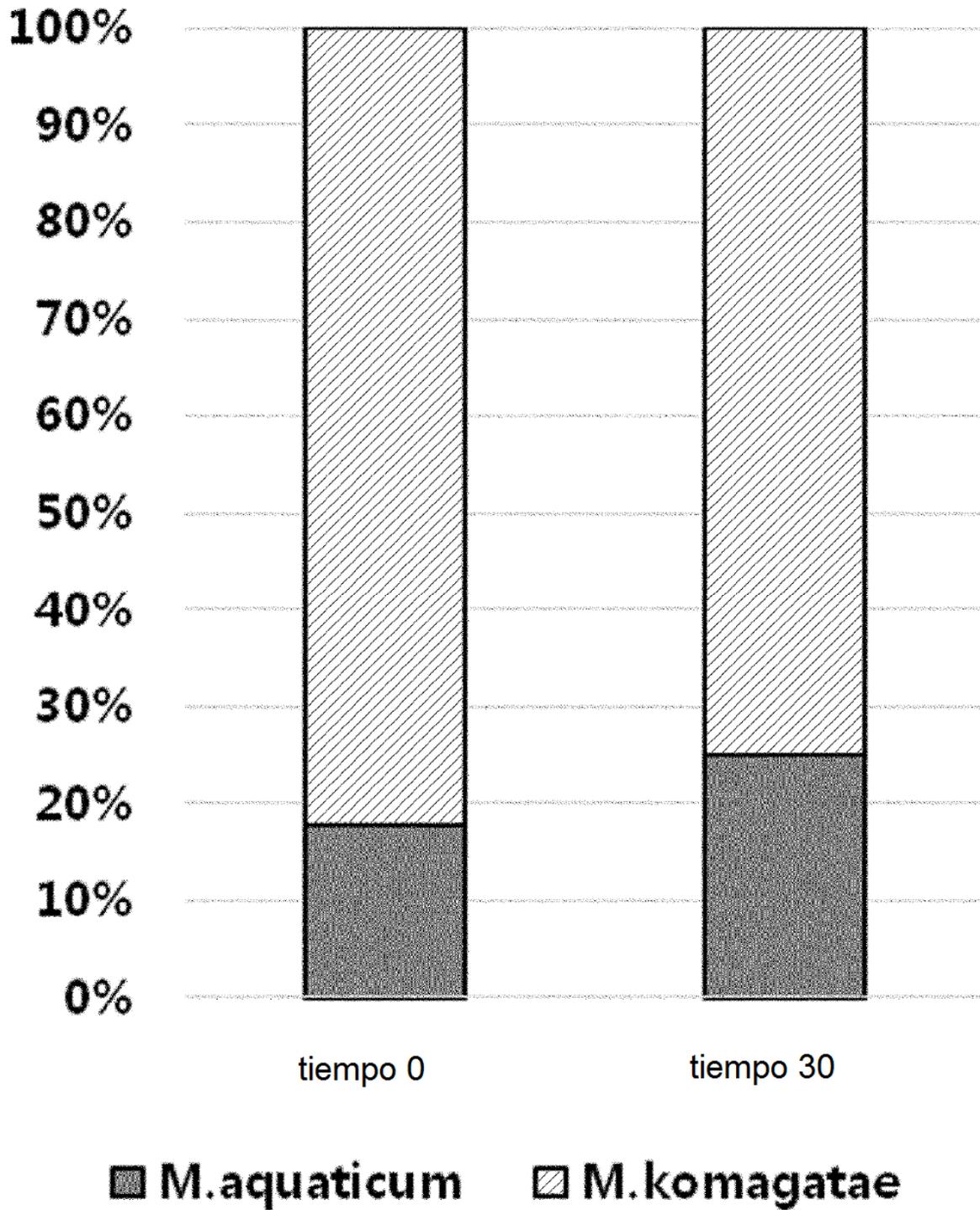


FIG. 10

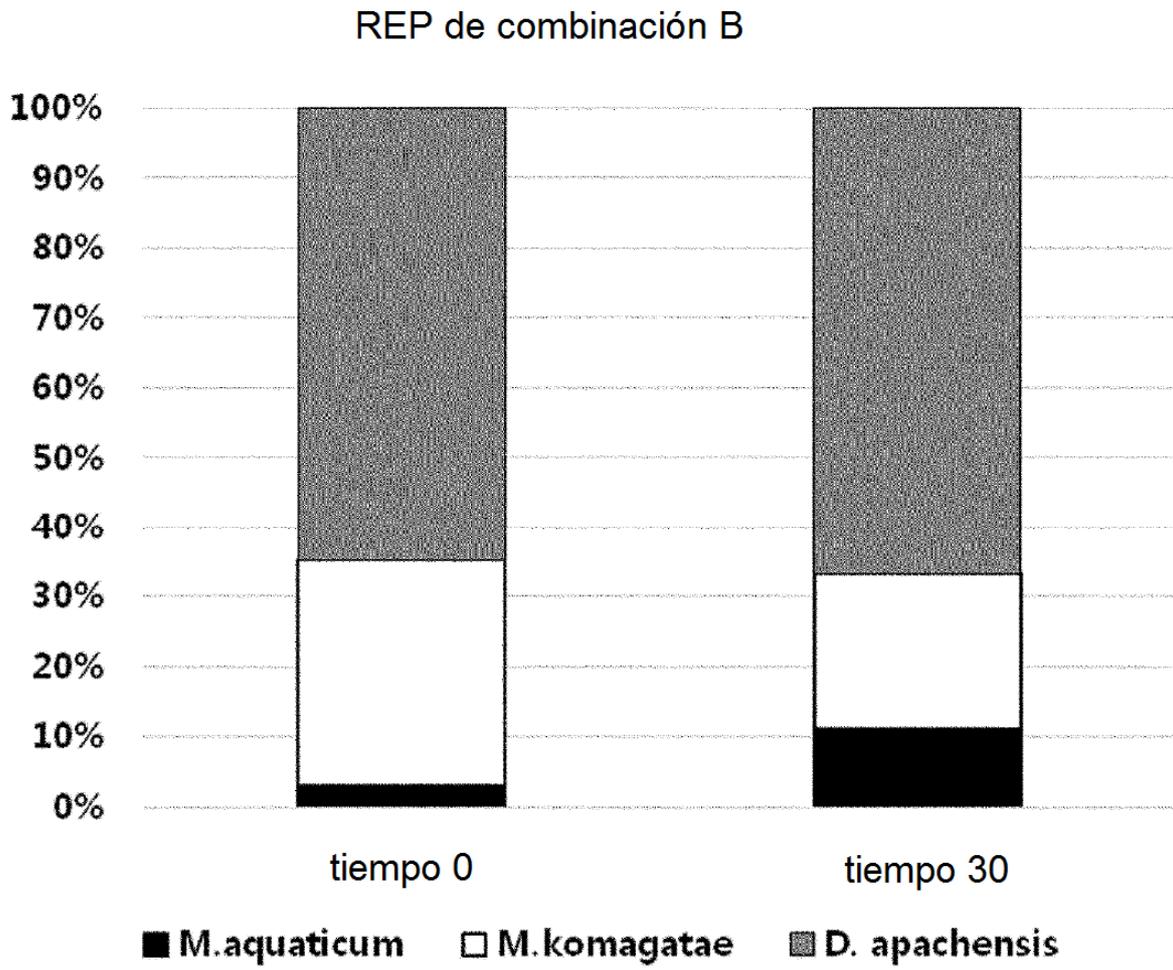


FIG. 11

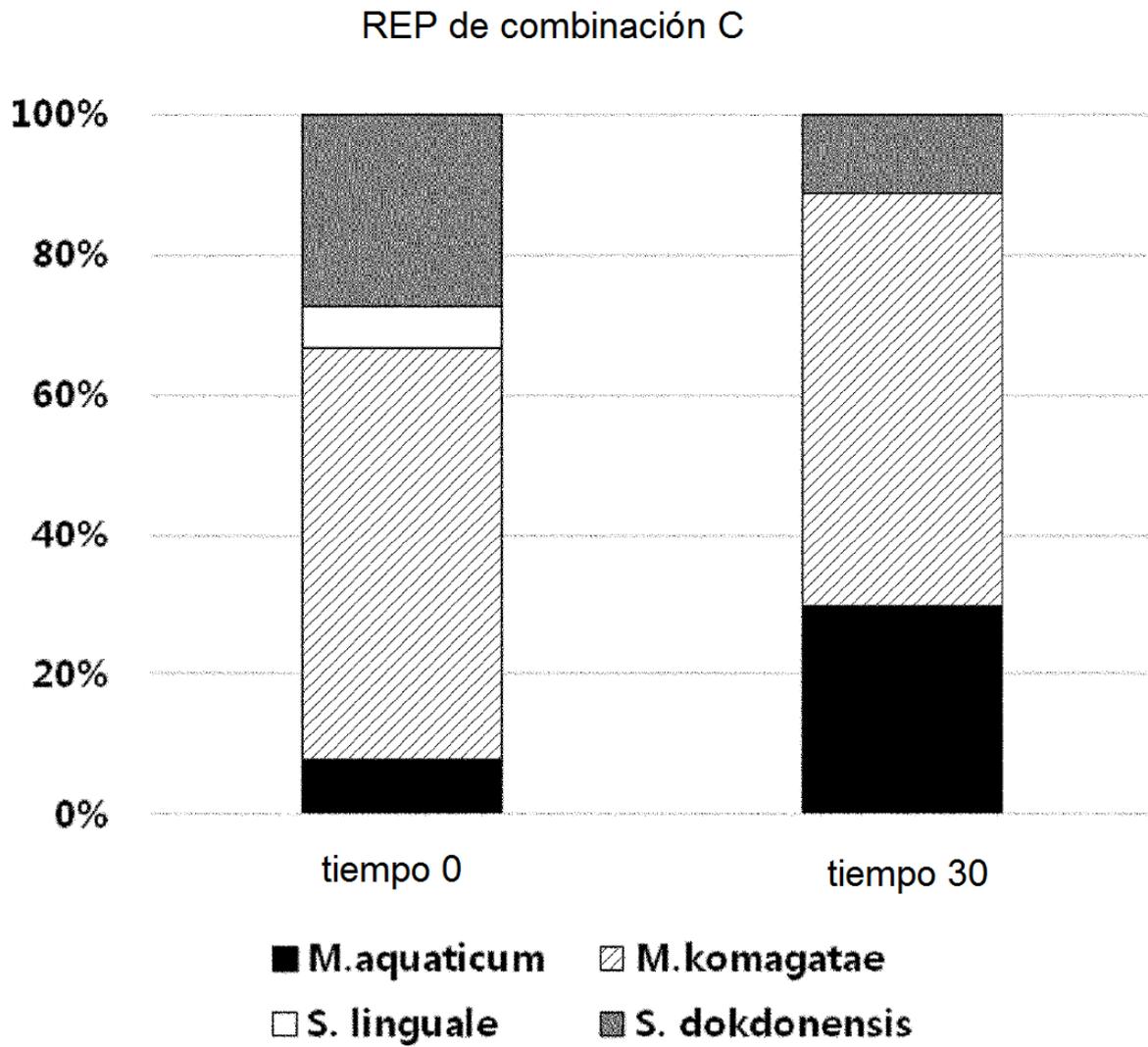


FIG. 12

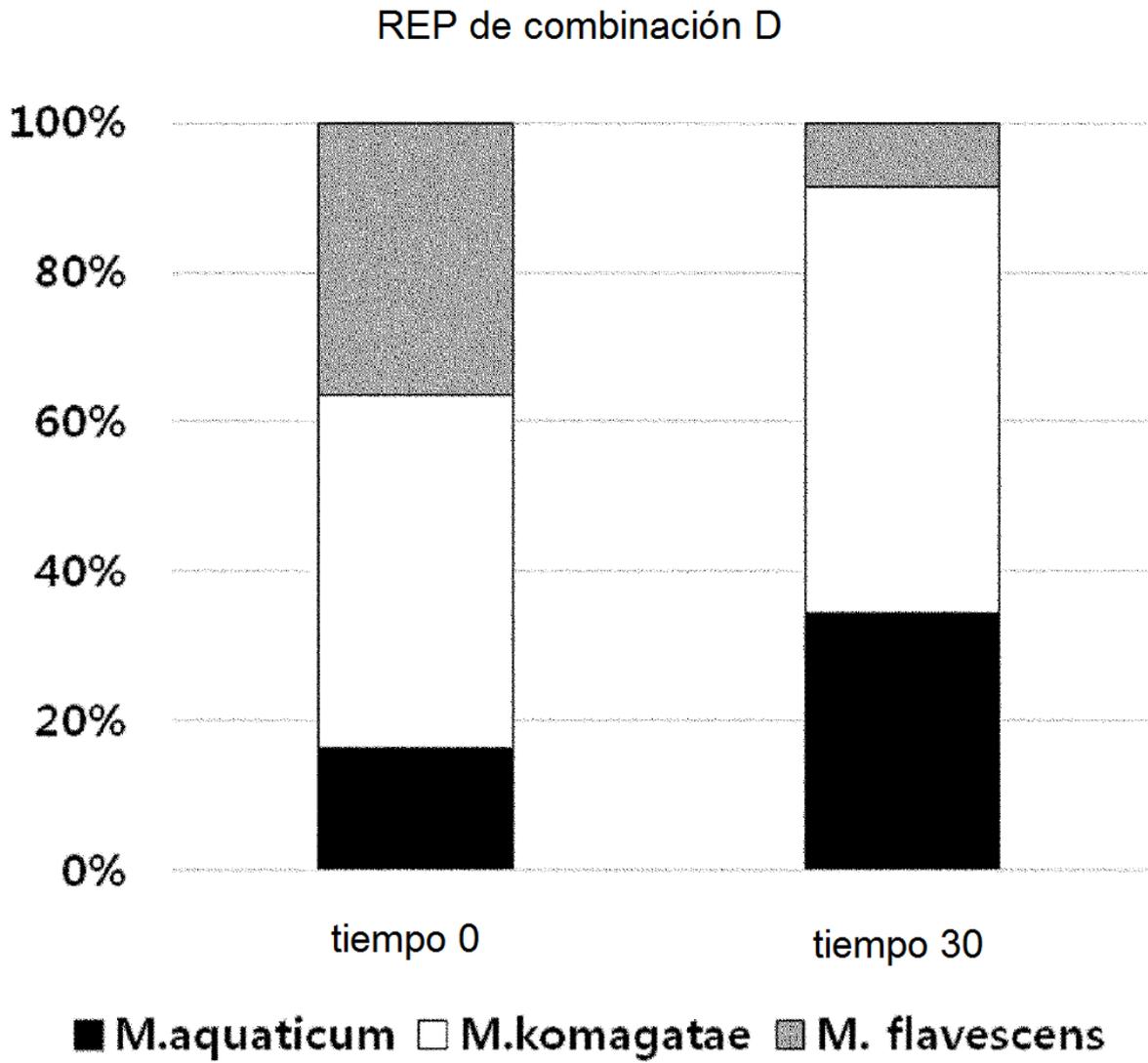


FIG. 13

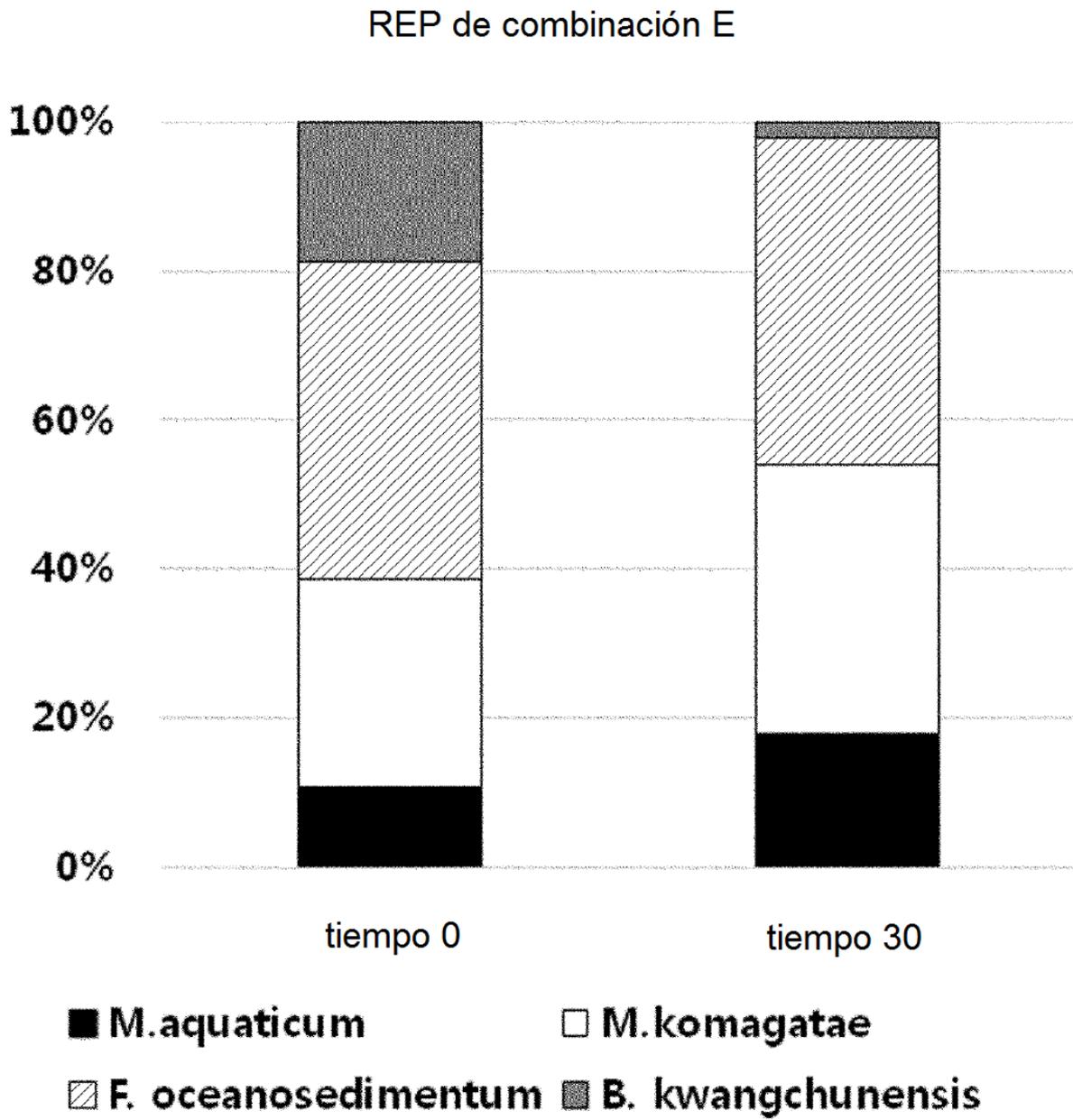


FIG. 14

REP de combinación F

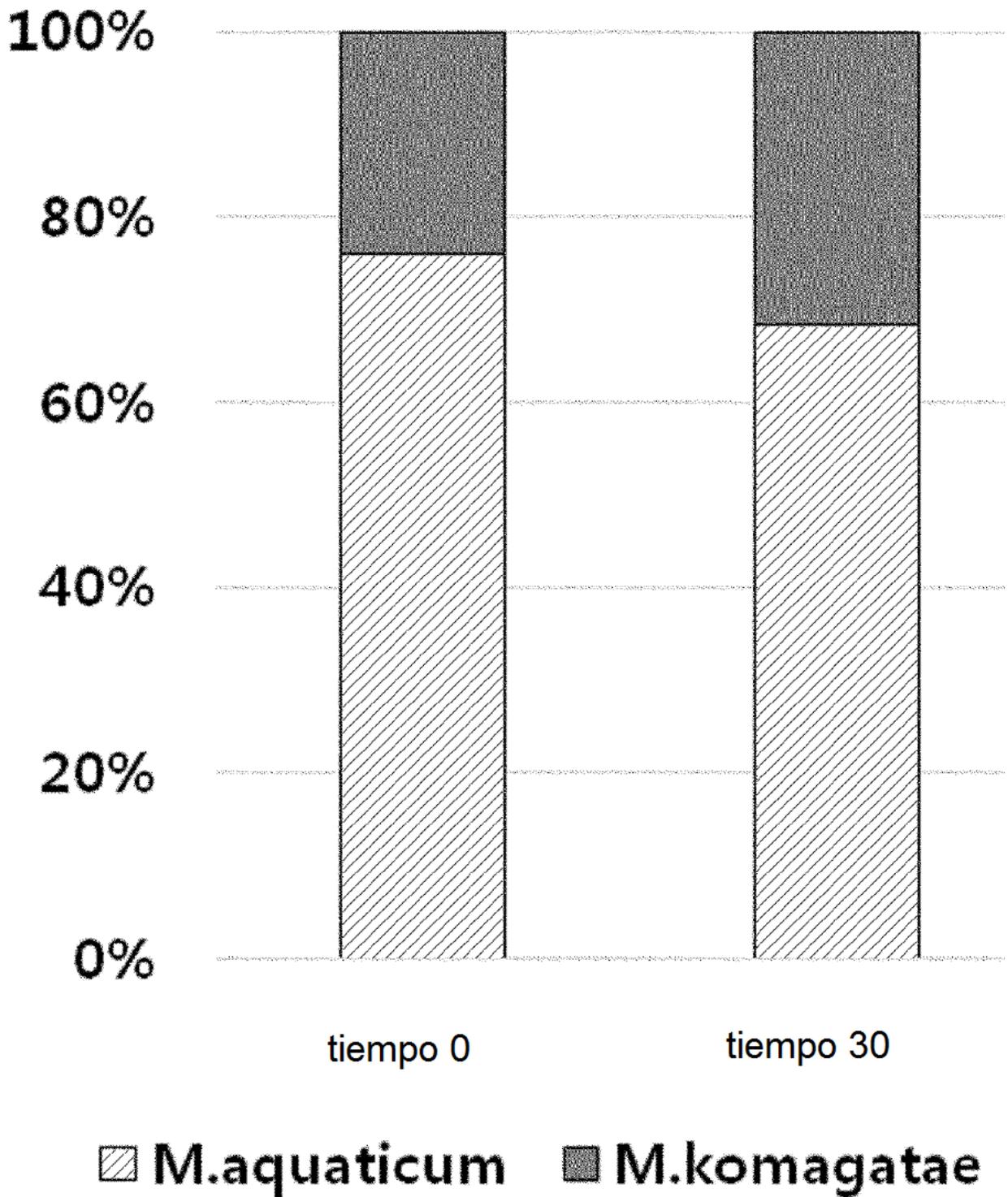


FIG. 15

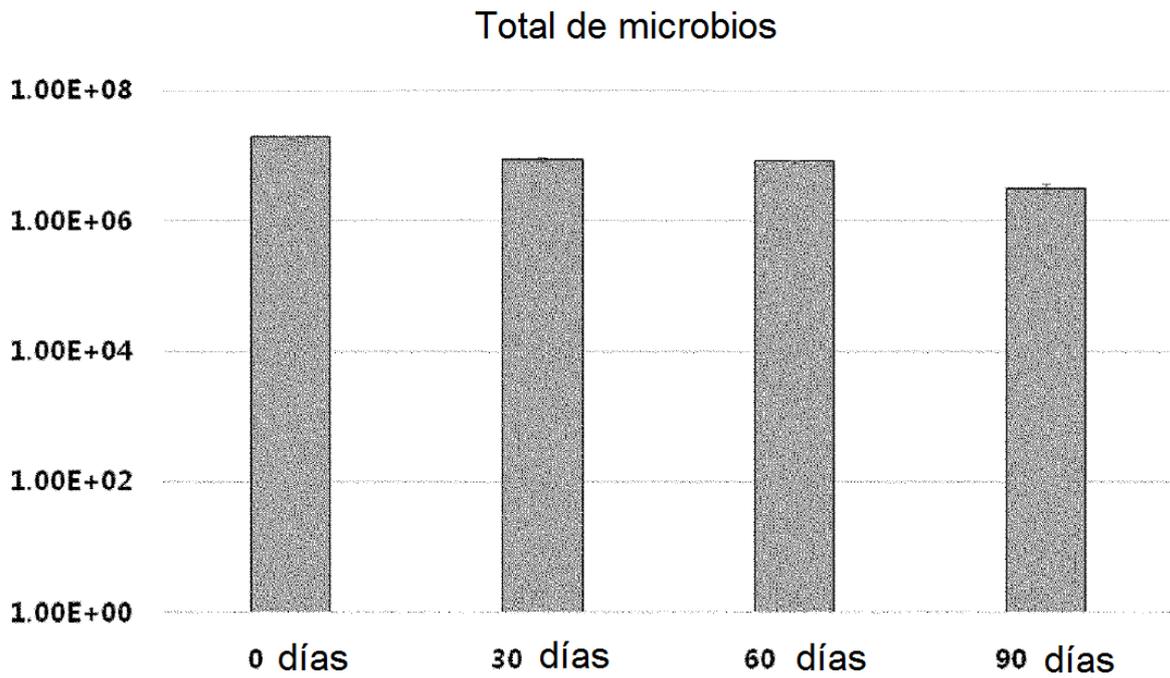


FIG. 16

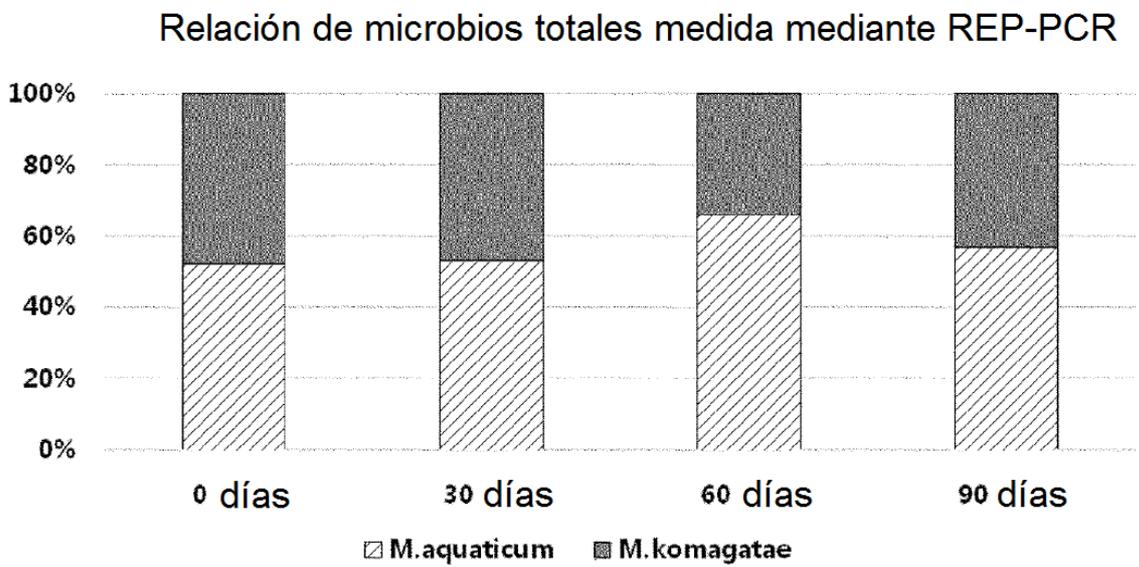


FIG. 17

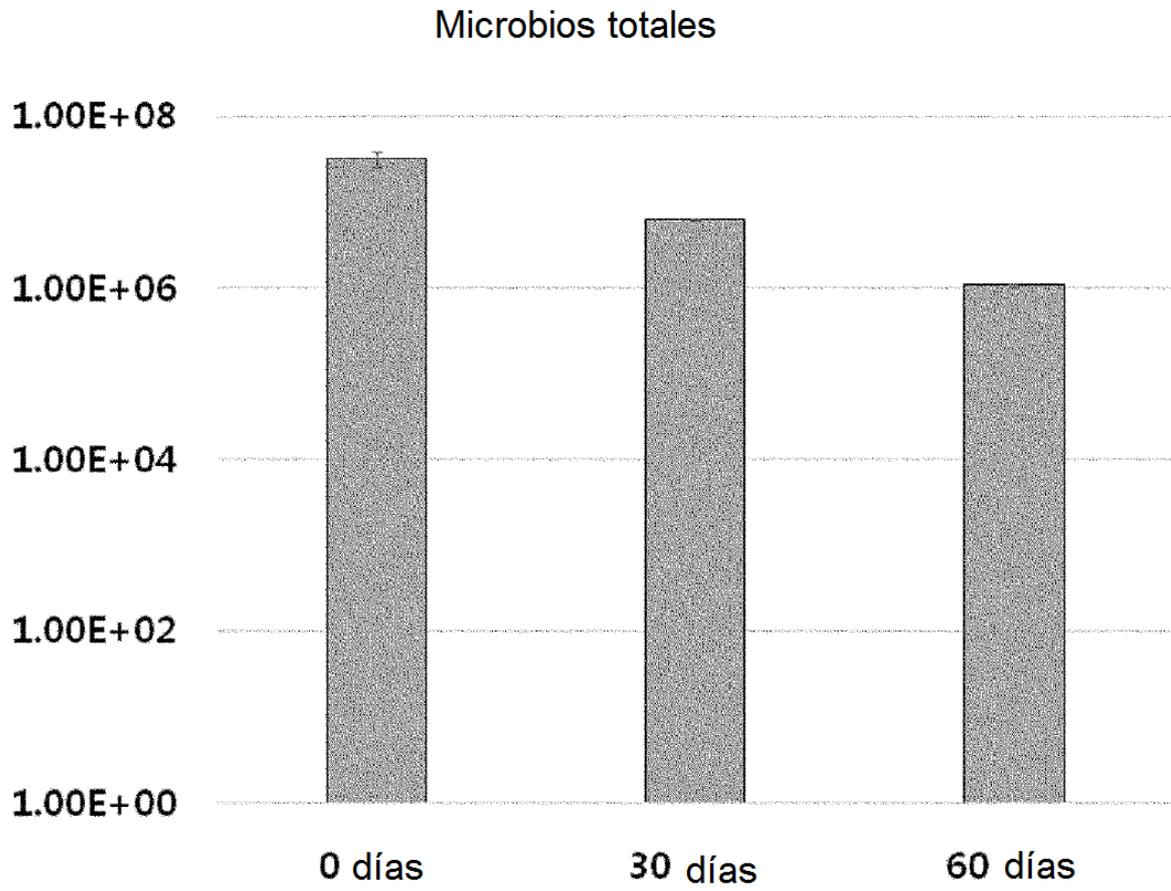


FIG. 18

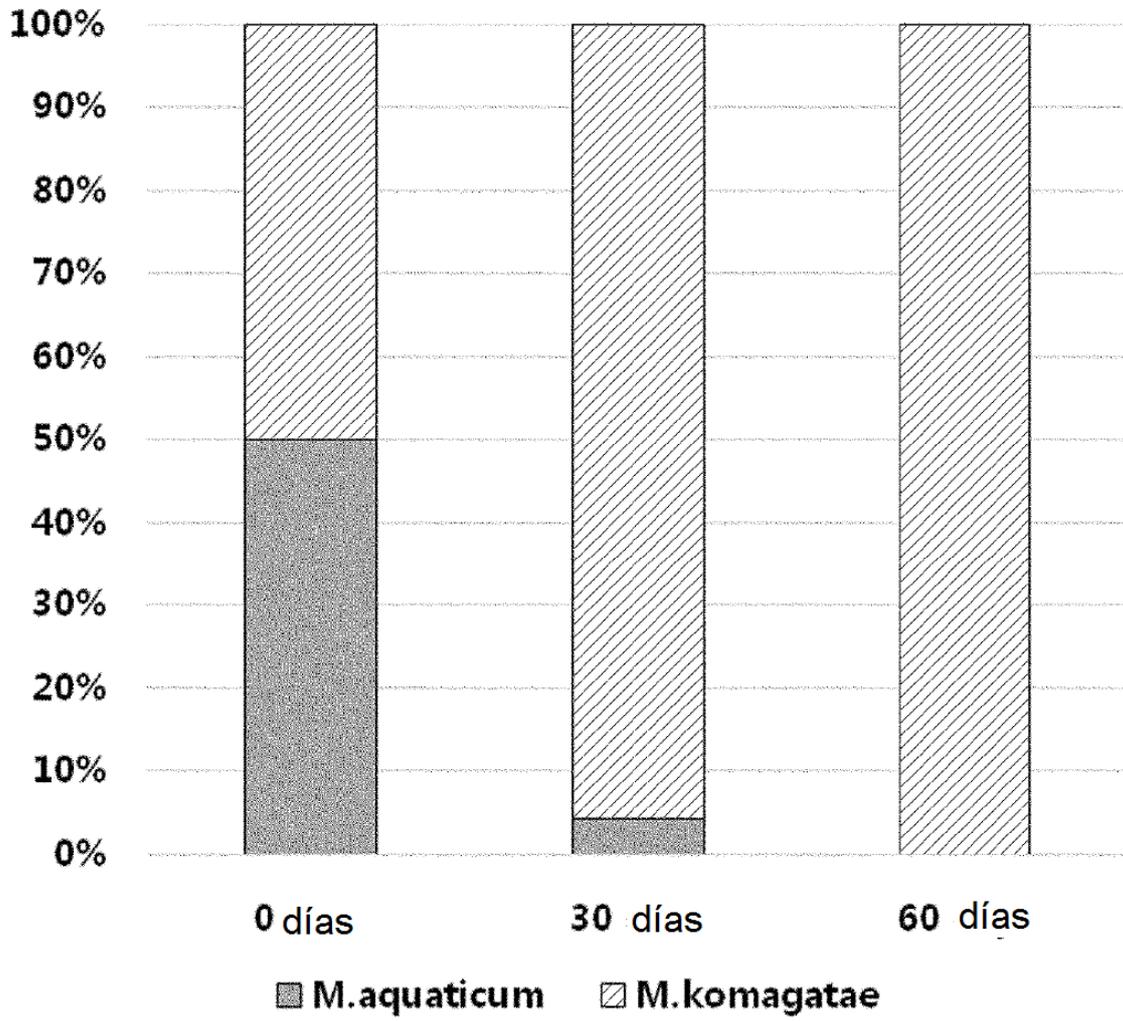


FIG. 19